

**Culture *in vitro* de tissus
de *Digitalis purpurea* L.,
Etude des métabolites secondaires
dérivés du stérane**

THÈSE

*présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève*

pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques

par
Lise GURNY-GASSER
de Zürich

Thèse N° 1861

1978

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

**Culture *in vitro* de tissus
de *Digitalis purpurea* L.,
Etude des métabolites secondaires
dérivés du stérane**

THÈSE

*présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève*

pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques

par
Lise GURNY-GASSER
de Zürich

Thèse N° 1861

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs I. KAPETANIDIS, professeur extraordinaire et directeur de thèse, A. MIRIMANOFF, professeur honoraire, R. TABACCHI, professeur (Université de Neuchâtel) et H. FRIEDRICH, professeur (Université de Münster - Allemagne) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 14 mars 1978

Le Doyen:
Bernard LEVRAT

Thèse N° 1861



Que le professeur I. KAPETANIDIS trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour l'intérêt et la disponibilité qu'il a bien voulu me témoigner au cours de ce travail entrepris sous sa direction.

J'exprime tous mes remerciements au professeur R. TABACCHI pour la réalisation des spectres de masse et leur interprétation.

Le professeur E. REINHARD et ses collaborateurs (Université de Tübingen), le Dr J. NAEF (chargé de cours à l'Université de Genève) et le professeur J.-P. ZRYD et ses collaborateurs (Université de Lausanne) ont accepté de discuter avec moi des nombreux problèmes posés par la culture des tissus, me faisant bénéficier de leur grande expérience dans ce domaine. Qu'ils en soient très chaleureusement remerciés.

Ma reconnaissance va également à tous ceux qui m'ont apporté leur concours, et tout particulièrement à Madame C. BAUD pour sa précieuse collaboration technique et au Dr R. GURNY pour l'élaboration des programmes de calcul sur l'ordinateur.

Les professeurs T. REICHSTEIN (Université de Bâle) et R. TSCHESCHE (Université de Bonn), ainsi que le Dr F. KAISER (Boehringer-Mannheim) ont aimablement mis à ma disposition des substances de référence rares. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma gratitude. Mes remerciements vont également au Dr B. SIEGFRIED (Zofingen) qui a bien voulu me procurer des semences de Digitale pourpre d'origine garantie.

Enfin, je ne saurais oublier Madame C. ARMAND pour la dactylographie du manuscrit et Monsieur J.-P. VUAGNIAUX pour la réalisation des graphiques.

Aux Miloux

Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

I	INTRODUCTION	1
II	LES CULTURES DE TISSUS, ASPECTS THEORIQUES	5
II.1	Historique	5
II.2	Les différents types de cultures de tissus	6
II.3	Les domaines d'application des cultures de tissus	10
II.3.1	Généralités	10
II.3.2	La production de principes actifs médicamenteux	11
III	LES DERIVES DU STERANE ELABORES PAR LA DIGITALE	
	POURPRE	14
III.1	Formules	14
III.1.1	Stérols	14
III.1.2	Sapogénines	18
III.1.3	Cardénolides	20
III.1.4	Digitanol-hétérosides	22
III.1.5	Dérivés du prégnane, précurseurs des cardénolides	23
III.2	Schémas de biosynthèse	25
IV	REALISATION DE CULTURES EN MILIEU SOLIDE	30
IV.1	Les milieux nutritifs	30
IV.1.1	Généralités	30
IV.1.2	Importance des différents constituants.	32
	Considérations théoriques.	

IV.1.3	Composition des milieux utilisés	47
IV.1.4	Technique de préparation	47
IV.2	Etablissement de la culture	48
IV.2.1	Choix des tissus initiaux	48
IV.2.2	Préparation des tissus stériles	50
IV.2.3	Préparation des explantats primaires et ensemencement	55
IV.2.4	Conditions de culture	59
IV.2.5	Développement des explantats primaires	60
IV.2.6	Repiquages	62
IV.2.6.1	Premier repiquage	62
IV.2.6.2	Repiquages de routine	63
IV.3	Evolution des cals	66
IV.3.1	Cals formés à partir de tissus de plantules	66
IV.3.2	Cals formés à partir de tissus de feuilles	67
IV.3.3	Cals formés à partir de tissus de tiges	68
IV.4	Sélection de clones ou souches	69
IV.5	Etudes de quelques facteurs susceptibles de modifier l'aspect, la croissance et le métabolisme des cals de Digitale pourpre	71
IV.5.1	But de l'expérience	71
IV.5.2	Conditions de travail	74
IV.5.3	Influence des facteurs étudiés sur l'aspect des cals	77
IV.5.4	Détermination de l'indice de croissance	81
IV.5.4.1	Définition et méthode de calcul	81

IV.5.4.2	Résultats	81
IV.5.4.3	Discussion des résultats	84
IV.5.5	Analyse par covariance de la croissance des tissus	87
IV.5.5.1	Description de la méthode	87
IV.5.5.2	Résultats	88
IV.5.5.3	Discussion des résultats	88
IV.5.6	Relation entre poids frais et poids sec	93
IV.5.6.1	Méthode	93
IV.5.6.2	Résultats	94
V	REALISATION DE CULTURES EN MILIEU LIQUIDE	95
V.1	Généralités	95
V.2	But de l'expérience	95
V.3	Etablissement de la culture	97
V.3.1	Réipients et appareillage	97
V.3.2	Méthode	98
V.3.3	Milieu utilisé	99
V.3.4	Conditions de culture	100
V.3.5	Repiquages	101
V.4	Evolution de la culture	102
V.5	Induction d'une organogénèse	106
V.5.1	Méthode utilisée	106
V.5.2	Résultats	107
VI	ANALYSE QUALITATIVE	112
VI.1	Recherche des hétérosides cardiotoniques	112
VI.1.1	Matériel analysé	112

VI.1.2	Méthode d'extraction	113
VI.1.3	Identification	114
VI.1.3.1	Méthode utilisée	114
VI.1.3.2	Résultats	118
VI.1.4	Analyse de contrôle	121
VI.1.4.1	Matériel utilisé	121
VI.1.4.2	Résultats	122
VI.1.5	Conclusions	124
VI.2	Recherche des stéroïds	126
VI.2.1	Matériel analysé	126
VI.2.2	Méthodes d'extraction	128
VI.2.3	Méthodes d'identification	133
VI.2.3.1	Chromatographie en phase gazeuse	134
VI.2.3.2	Spectrométrie de masse	141
VI.2.3.3	Réaction colorée	143
VI.2.4	Résultats et discussion	144
VI.3	Recherche des sapogénines et des dérivés du prégnane	157
VI.3.1	Matériel analysé	157
VI.3.2	Méthodes d'extraction	159
VI.3.3	Méthodes d'identification	160
VI.3.3.1	Chromatographie en phase gazeuse	160
VI.3.3.2	Chromatographie sur couche mince	160
VI.3.4	Résultats	165

VII	ANALYSE QUANTITATIVE	170
VII.1	But de l'expérience	170
VII.2	Matériel utilisé	170
VII.3	Méthode d'extraction	170
VII.4	Méthode de dosage	171
VII.4.1	Choix de la méthode	171
VII.4.2	Mesure de l'aire des pics	172
VII.4.3	Facteurs de proportionnalité	175
VII.4.4	Etalons internes	176
VII.4.5	Substances de référence - courbes d'étalonnage	178
VII.4.6	Analyse quantitative des extraits	180
VII.4.7	Traitement des données et résultats	180
VII.4.8	Conclusions	184
VIII	CONCLUSIONS GENERALES ET RESUME	219
IX	BIBLIOGRAPHIE	226

I. Introduction

La synthèse de principes actifs médicamenteux dont la molécule présente à la fois des particularités stéréochimiques et une structure complexe, n'est pas rentable sur le plan économique. De ce fait, des médicaments aussi importants que les hétérosides cardiotoniques ou les alcaloïdes de l'opium, sont encore obtenus par extraction à partir des végétaux, et leur production reste fortement dépendante d'un certain nombre de facteurs difficiles ou impossibles à maîtriser par l'homme (conditions climatiques, maladies, parasites, facteurs sociaux, politiques, etc...).

L'avènement de la culture des tissus végétaux a créé l'espoir, fondé sur quelques premiers succès, de domestication de la cellule végétale dans le but d'obtenir à volonté des métabolites secondaires physiologiquement actifs et indispensables à la thérapeutique moderne¹.

C'est pourquoi, dès la fin des années cinquante, des chercheurs commencèrent à s'intéresser à cette nouvelle technique. En 1957, West et coll.² extrayaient l'atropine des cultures de tissus d'*Atropa belladonna*. Dès 1959, Tulecke et Nickell^{3,4,5} s'intéressaient les premiers à la production *in vitro*, à grande échelle, de tis-

sus végétaux, dans le but d'en extraire des principes actifs d'intérêt pharmaceutique.

Depuis cette date, le nombre des travaux étudiant les possibilités offertes par les cultures de tissus végétaux dans les domaines de la biosynthèse ou de la biotransformation de métabolites secondaires, n'a cessé de s'accroître.

C'est *Staba* qui, en 1962, s'intéressa le premier aux cultures de tissus de Digitale⁶ (*Digitalis lanata* EHRH. et *Digitalis purpurea* L.). Les travaux qu'il effectua avec ses collaborateurs prouvèrent la présence de substances réagissant positivement avec le réactif de *Kedde*. Des essais pharmacologiques démontrèrent une certaine "activité cardiovasculaire" des extraits de ces cultures⁷⁻⁹. D'autres chercheurs se penchèrent alors sur ce sujet, mais les résultats qu'ils obtinrent ne furent pas toujours concordants. *Medora*¹⁰ en 1967, démontra également une activité pharmacologique sur des animaux auxquels il avait administré des extraits de cultures *in vitro* de *Digitalis mertonensis* BUXTON et DARL. ex TURILL. Par contre, *Pilgrim*¹¹ ne put mettre en évidence d'hétérosides cardiotoniques dans les cultures de tissus de *Digitalis purpurea*, phénomène qu'il attribua plus tard (1972) à l'absence de l'enzyme responsable de la scission de la chaîne latérale

du cholestérol, entre C_{20} et C_{22} et C_{22} ¹². La même année, se fondant sur le résultat d'analyses chromatographiques sur couche mince et d'essais pharmacologiques, *Pettiard* et *coll.*¹³ conclurent à la présence des mêmes cardénolides dans les cultures de tissus que dans la plante entière de Digitale pourpre. Utilisant également la chromatographie sur couche mince, *Turner*¹⁴ conclut de son côté à l'absence d'hétérosides cardiotoniques dans les cultures de tissus de *Digitalis purpurea* et *D. lanata*. Enfin, tout récemment *Kartnig* mit en évidence, par chromatographie sur couche mince, une quinzaine de cardénolides dans les extraits de cultures de tissus de Digitale pourpre. Selon ses observations cependant, ces cultures de tissus perdent leur faculté de biosynthèse après quelques passages¹⁵.

Ce bref survol de la littérature démontre que l'unanimité n'est pas faite en ce qui concerne la biosynthèse des cardénolides dans les cultures de tissus de Digitale. Il faut relever encore qu'aucun hétéroside, ni aucune génine n'a été isolé par les auteurs des travaux mentionnés ci-dessus.

Des travaux relatifs à la biosynthèse des hétérosides cardiotoniques^{16,18} et des stéroïdes^{56,80,93,94} ont été effectués en très grand nombre sur les plantes entières de Digitale, mais en nombre extrêmement restreint

sur les cultures de tissus de ces mêmes plantes.

Etant donné le grand intérêt que revêt la biosynthèse des cardénolides, nous avons choisi comme but de ce travail d'établir des cultures de tissus indifférenciés de *Digitalis purpurea*, puis de vérifier, dans un premier stade, si, dans nos conditions de travail, ces cultures sont capables d'effectuer la biosynthèse d'hétérosides cardiotoniques.

En absence de cardénolides, nous avons pensé qu'il serait intéressant, dans une deuxième étape, de déterminer quel est le stade ultime de biotransformation des composés stéroïdiques, que les cellules indifférenciées de *Digitalis purpurea* sont capables d'opérer.

Nous nous sommes proposé ensuite d'étudier si des variables telles que l'origine de la souche ou la composition du milieu nutritif peuvent influencer la biosynthèse de ces composés et dans quelle mesure.

En conclusion à nos expériences enfin, notre intention était d'essayer de discerner les facteurs pouvant stimuler la biosynthèse des hétérosides cardiotoniques.

II. Les cultures de tissus, aspects théoriques

II.1 Historique

La culture des tissus végétaux a pris naissance à la fin du siècle dernier avec les travaux de *Haberlandt*. En 1902, cet auteur publiait un mémoire²³, dans lequel il exprimait son désir de cultiver des cellules végétales isolées sur des milieux synthétiques. Malgré l'échec de ses tentatives, il entrevoyait déjà tout l'intérêt de ce genre de cultures.

Il fallut attendre l'année 1934 pour que *White*²⁴ et *Gautheret*²⁵ réussissent à obtenir des cultures permanentes en milieu synthétique, de fragments de tissus de plantes supérieures.

Dans les années qui suivirent, *White*²⁶ découvrit l'importance des vitamines du complexe B et *Went*²⁷ celle de l'auxine (acide indolyl-3-acétique).

En 1939, *White*²⁸ et *Gautheret*²⁹ obtinrent, indépendamment l'un de l'autre, les premières cultures de tissus indifférenciés. La technique de base pour l'établissement de cultures de tissus décrite dans leurs publications, a servi de point de départ à des cultures de très nombreuses espèces végétales.

Les travaux qui suivirent figurent parmi les étapes importantes qui marquèrent la suite du développement de la culture des tissus végétaux.

En 1954, Muir et coll.³⁰, réalisant enfin le souhait de Haberlandt, réussirent à établir et à repiquer une culture de cellules isolées et d'agrégats de cellules dans un milieu liquide agité. En 1960, Bergmann³¹ mit au point la technique permettant d'obtenir des clones unicellulaires. La même année, Cocking³² parvint à établir une culture de protoplastes. Dès 1971, on assiste à la régénération de plantes entières à partir de protoplastes³³, puis à la fusion de protoplastes^{34,35}. L'hybridation des protoplastes représente la dernière découverte importante dans le domaine de la culture de cellules végétales^{36,37}. Cette technique conduit à la création de cellules hybrides capables de se diviser pour former un cal, puis régénérer des plantes entières. Lorsqu'elle sera devenue plus facilement accessible, des perspectives immenses s'ouvriront dans la production de nouvelles variétés végétales, grâce aux nouvelles possibilités de combinaisons de génotypes.

II.2 Les différents types de cultures de tissus

L'expression "culture de tissus végétaux" englobe fréquemment tous les types de cultures de fragments

végétaux en milieu aseptique et dont les principaux sont :

- Les cultures d'organes qui dérivent d'extrémités de tiges ou de racines, d'ébauches foliaires ou florales ou encore de fruits immatures.

- Les cultures de tissus proprement dites, appelées aussi cultures de cals qui proviennent de la prolifération de cellules sur des fragments d'organes végétaux (explantats). Ces tissus ne correspondent à aucun tissu organisé normal de la plante entière. Le terme de "cal" suggère que le tissu formé peut être comparé à un cal qui se forme sur une blessure. Cependant, la blessure causée au tissu par l'excision de l'explantat n'est qu'une des causes de la prolifération. Selon toute vraisemblance, deux autres facteurs interviennent de manière déterminante dans cette prolifération : le fait que le tissu n'est plus sous le contrôle de la plante entière, ainsi que l'apport de certaines matières nutritives et de facteurs de croissance.

L'expression "culture de tissus" évoque le fait que ces cultures ont comme origine différents tissus d'une même plante. Il convient toutefois de souligner déjà à cette place que les cultures de tissus d'une même plante peuvent varier beaucoup entre elles, dans leur morphologie, leur structure cellulaire, leur croissance et leur métabolisme.

Les cultures de cals sont toujours formées de cellules en division et de cellules végétatives.

Le terme "culture de tissus" peut être appliqué à toute culture sur milieu solide, formée de nombreuses cellules; il n'implique pas d'homogénéité dans la structure ou dans la fonction des cellules³⁸.

- Les cultures en suspension, appelées aussi cultures de cellules sont formées de cellules isolées et d'agrégats de cellules dispersés dans un milieu liquide agité. Il n'existe pas encore de cultures formées uniquement de cellules isolées. L'expression "culture de cellules" est justifiée par le fait que le niveau d'organisation est nettement inférieur à celui des cultures de tissus.

Le terme "culture de cellules" qualifie aussi parfois les cultures de souches dérivant d'une seule cellule (clones).

Les cultures en suspension ont souvent été qualifiées de méristématiques car leur fonction principale est la multiplication; mais, du fait qu'elles développent des vacuoles, la plupart de ces cellules diffèrent de celles des méristèmes apicaux³⁹.

Le grand avantage des cultures sur milieu solide, est leur extrême simplicité : elles ne nécessitent pas d'équipement spécial et prennent peu de place. Néanmoins, elles

sont de plus en plus fréquemment remplacées par les cultures en suspension. Pour expliquer ce changement, il suffit de considérer les inconvénients de la culture sur milieu solide :

- seule une partie du cal ou de l'explantat est en contact avec le milieu. Il se crée petit à petit des gradients de concentration en matières nutritives dans le milieu et dans le cal;
- les tissus de la base du cal ne bénéficient pas des mêmes échanges gazeux que ceux de la surface;
- des métabolites toxiques peuvent s'accumuler.

La culture en suspension supprime la plupart des inconvénients cités :

- l'agitation du milieu facilite les échanges gazeux;
- toutes les cellules sont en contact étroit avec un milieu nutritif maintenu homogène;
- les produits toxiques sont répartis dans tout le volume du milieu nutritif.

De ce fait, on tend de plus en plus à n'utiliser les cultures sur milieu solide que pour l'entretien des souches ou comme étape préliminaire dans l'établissement de cultures de cellules.

II.3 Les domaines d'application des cultures de tissus

II.3.1 Généralités

La culture des tissus végétaux laisse entrevoir des possibilités d'application immenses dans des domaines aussi variés que la sélection, l'entretien et la reproduction de variétés horticoles et agricoles intéressantes^{40,41}; la production de substances pharmacologiquement actives (alcaloïdes^{42,43}, antibiotiques⁴⁴, stéroïdes⁴⁵, etc); les études de toxicologie⁴⁶ (études de l'effet de microorganismes, de produits chimiques ou des radiations sur les végétaux); les études de cytologie et de génétique⁴⁶; la recherche fondamentale sur le cancer⁴⁷ et les études de phytopathologie.

Une grande partie des recherches entreprises dans ces domaines ont été rendues possibles par l'établissement de clones dérivant de cellules uniques, donc morphologiquement et génétiquement uniformes^{30,31}.

Dans ces différentes applications, la culture de tissus remplace les cultures en pleine terre avec certains avantages, puisque l'influence de facteurs de variation tels que l'ensoleillement, la température, le facteur édaphique, les maladies, etc., est maintenue constante ou même réduite à zéro. Elle offre une structure biolo-

gique simple, facilement reproductible, disponible en permanence; de plus, les tissus se développent dans un milieu parfaitement défini chimiquement, ce qui constitue également un avantage.

Cependant, cette technique présente aussi des inconvénients. En effet, tout travail relatif à la culture des tissus végétaux contient un bon nombre d'éléments empiriques. Une approche systématique des problèmes n'amène pas forcément une solution³⁸. Un des inconvénients majeurs est l'instabilité chromosomique des cellules⁴⁸, qui restreint les applications de la culture des tissus. En effet, les expériences réalisées jusqu'à ce jour semblent prouver que les techniques actuellement disponibles ne permettent pas de préserver et de perpétuer un génotype³⁸. Enfin, la culture des tissus reste une méthode très coûteuse de par les conditions particulières qu'elle exige.

II.3.2 La production de principes actifs médicamenteux

A la suite des travaux de West et coll.⁴⁹ et de Inlecke et Nickell^{44,50,51}, en 1959 et 1960, de très nombreuses recherches ont été effectuées dans le but de produire des substances pharmaceutiques intéressantes, d'une façon analogue à la production d'antibiotiques par les cultures de microorganismes.

De nombreux principes actifs ont pu être identifiés dans ces cultures :

- des alcaloïdes : atropine (*Atropa belladonna*⁴⁹),
réserpine (*Alstonia constricta*⁵²),
nicotine (*Nicotiana tabacum*⁴²)
hyoscyamine et scopolamine (*Datura stramonium*⁵³).
- des stérols : sitostérol, stigmastérol et campestérol (entre autres dans *Nicotiana tabacum*⁵⁴, *Sesamum indicum*⁵⁵, *Trigonella oeculta*⁵⁶), cholestérol (*Sesamum indicum*⁵⁵).
- des sapogénines : diosgénine (*Dioscorea deltoidea*⁵⁷, *D. composita*⁵⁸ et *D. tokoro*, *Trigonella foenum-graecum*⁵⁹), tigogénine et gito-génine (*Trigonella foenum-graecum*⁵⁹).
- des furannochromones:visnagine (*Ammi visnaga*⁶⁰).
- des coumarines : (*Ruta graveolens*⁶¹).
- des acides aminés : insuline (*Momordica charantia*⁶²).
- des anthraquinones : digitolutéine et hydroxy-4-digitolutéine (*Digitalis lanata*⁶³).

A part quelques exceptions (diosgénine, visnagine et certains alcaloïdes), les rendements en principes actifs de la plupart de ces cultures de tissus sont nettement inférieurs à ceux des plantes entières.

Nombreux sont également les métabolites secondaires d'un grand intérêt pharmaceutique, qui ne semblent pas être synthétisés par les cultures de tissus.

Par contre, dans certains cas, des substances analogues mais non identiques à celles produites par les plantes en-

tières ont été découvertes^{64,48}. Les cultures de tissus pourraient donc constituer une source de nouveaux principes actifs.

Les succès obtenus dans le domaine des biotransformations de principes actifs par les cultures de tissus ouvrent également de nouvelles perspectives : biotransformations de cardénolides^{65,66}, de progestérone et de prégnénolone^{67,68}, déméthylation de la thébaïne⁶⁹, etc...

Avant que les cultures de tissus ne puissent être utilisées pour la production commerciale, de nombreux problèmes restent à résoudre. Il faudra être en mesure de sélectionner et de stabiliser des mutants qui produisent les substances désirées, avec un rendement suffisamment élevé, pour que cette méthode de production soit compétitive, sur le plan économique, avec les procédés traditionnels.

III. Les dérivés du stérane élaborés par la
Digitale pourpre (plante entière)

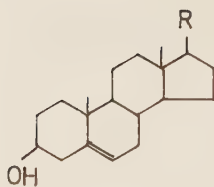
III.1 Formules

III.1.1 Stérols

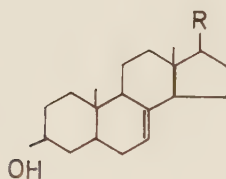
Déméthyl-4-stérols

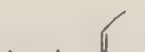
Ces stérols se subdivisent en 2 groupes :

- Δ^5 :



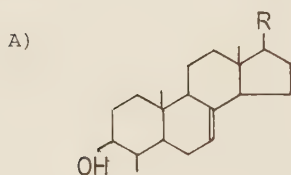
- Δ^7 :



	Nombre de C	Δ	R
Cholestérol	C ₂₇	5	
Δ^7 -Cholestérol	C ₂₇	7	
Méthylène-24-cholestérol	C ₂₈	5	
Δ^7 -Méthylène-24-cholestérol	C ₂₈	7	
Campestérol	C ₂₈	5	
Δ^7 -Campestérol	C ₂₈	7	
Stigmastérol	C ₂₉	5	
β -Sitostérol	C ₂₉	5	
Δ^7 -Dihydrostigmastérol	C ₂₉	7	
Fucostérol	C ₂₉	5	
Isofucostérol	C ₂₉	5	
Δ^7 -Isofucostérol	C ₂₉	7	

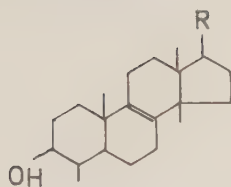
Méthyl-4-stérols⁷⁰

Ces stérols se subdivisent en 3 groupes :



	Nombre de C	R
1) Méthyl-24-lophénol	C ₂₉	
2) Ethyl-24-lophénol	C ₃₀	
3) Méthylène-24-lophénol	C ₂₉	
4) Ethylidène-24-lophénol	C ₃₀	

B)



Nombre
de C

R

1) Obtusifoliol

C₃₀



2) Méthyl-4 α -zymostérol

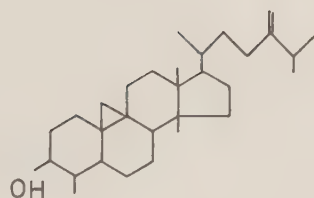
C₂₉



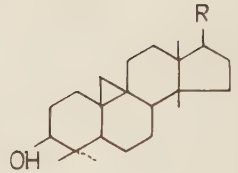
C)

Cycloeucalénol

C₃₀



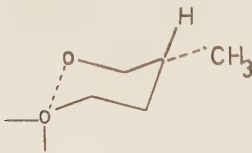
Diméthyl-4,4'-stérols (ou triterpènes)⁷⁰



	Nombre de C	R
1) Cycloarténol	C ₃₀	
2) Méthylène-24-cycloarténol	C ₃₁	

III.1.2 Saponénines (ou spirostanols)⁷¹

Elles se trouvent au nombre de 4, mais chacune possède 2 isomères en 25 (ces 2 isomères ont pu être isolés à partir de la graine)⁷² :



25 α

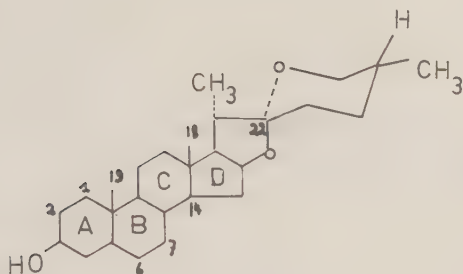


25 β

Configuration : cycles A/B cis⁷³

B/C trans

C/D trans



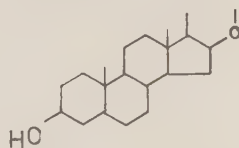
Génine

Formule
brute

Formule
développée

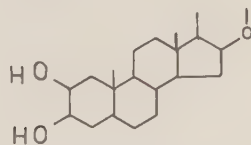
Tigogénine

$C_{27}H_{44}O_3$
(3 β -ol)



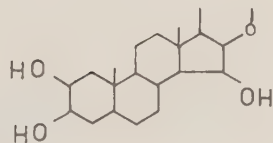
Gitogénine

$C_{27}H_{44}O_4$
(2 α ,3 β -diol)



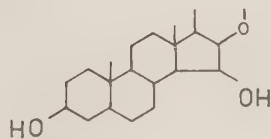
Digitogénine

$C_{27}H_{44}O_5$
(2 α ,3 β ,15 β -triol)



Digalogénine

$C_{27}H_{44}O_4$
(3 β ,15 β -diol)



Ces sapogénines se trouvent toujours sous forme d'hétérosides. Dans les graines on trouve surtout :

- Gitonine = gitogénine + 1 glucose + 2 galactoses + 1 xylose
- Digitonine = digitogénine + 2 glucoses + 2 galactoses + 1 xylose
- Digalonine = digalogénine + 2 glucoses + 2 galactoses + 1 xylose
- Déglucotigonine = tigogénine + 1 glucose + 2 galactoses + 1 xylose
- Déglucodigitonine.

Dans les feuilles :

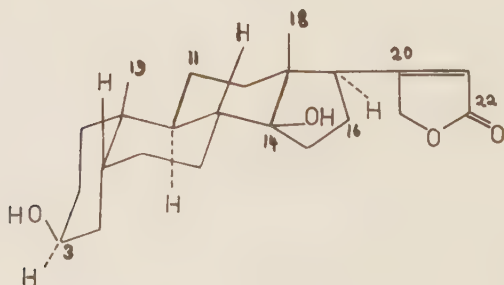
- Tigogénine-tétraoside = tigogénine + 2 glucoses + 1 galactose + 1 xylose
- Gitogénine-tétraoside = gitogénine + 2 glucoses + 1 galactose + 1 xylose.

III.1.3 Cardénolides

Configuration : cycles A/B cis

B/C trans

C/D cis



Les différents hétérosides cardiotoniques de la Digitale ne diffèrent entre eux que par les substituants en position 12 et 16 et par les sucres auxquels les génines sont liées en position 3.

Composition des principaux
hétérosides de *Digitalis purpurea*

<u>Hétérosides</u>	<u>Sucres</u>
a) Dérivés de la digitoxigénine :	
Purpuréa-glucoside A	3 digitoxoses, 1 glucose
Digitoxine	3 digitoxoses
Glucodigitoxigénine-bis- digitoxoside	2 digitoxoses, 1 glucose
Glucoévatromonoside	1 digitoxose, 1 glucose
b) Dérivés de la gitoxigénine :	
Purpuréa-glucoside B	3 digitoxoses, 1 glucose
Gitoxine	3 digitoxoses
Glucogitoroside	1 digitoxose, 1 glucose
Digitalinum verum	1 digitalose, 1 glucose
Strospéside	1 digitalose
c) Dérivés de la gitaloxigénine :	
Glucogitaloxine	3 digitoxoses, 1 glucose
Gitaloxine	3 digitoxoses
Glucogitaloxigénine-bis- digitoxoside	2 digitoxoses, 1 glucose
Glucolanadoxine	1 digitoxose, 1 glucose
Glucovérodoxine	1 digitalose, 1 glucose
Vérodoxine	1 digitalose

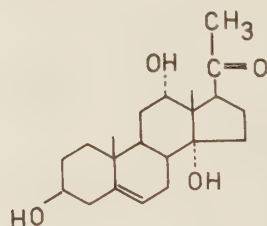
<u>Aglucones</u>	<u>Formules brutes</u>	<u>Substituants</u>
Digitoxigénine	$C_{23}H_{34}O_4$	-OH 3 β , 14 β
Gitoxigénine	$C_{23}H_{34}O_5$	-OH 3 β , 14 β , 16 β
Gitaloxigénine	$C_{24}H_{34}O_6$	-OH 3 β , 14 β -O-CHO 16 β

III.1.4 *Digitanol hétérosides (ou prégnane-hétérosides)*⁷⁴

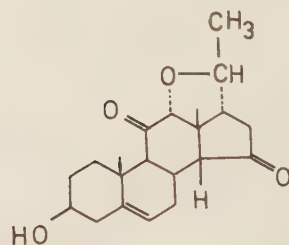
<u>Aglucones</u>	<u>Formules brutes</u>	<u>Formules développées</u>
------------------	------------------------	-----------------------------

Digiturpurogénine $C_{21}H_{32}O_4$

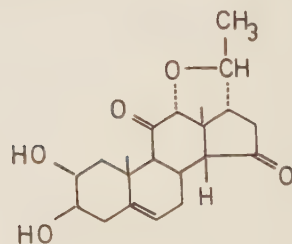
(Δ^5 -Prégnénetriol-
3 β , 12 α , 14 α -one-20)



Diginigénine $C_{21}H_{28}O_4$



Digifologénine $C_{21}H_{28}O_5$

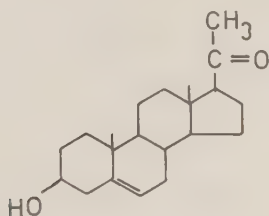


Ces 3 stéroïdes ont été isolés à partir des feuilles de *Digitalis purpurea*⁷⁵, sous forme d'hétérosides :

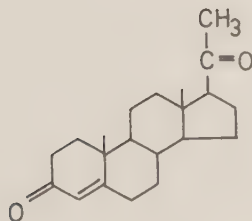
<u>Aglucones</u>	<u>Sucres</u>	<u>Hétérosides</u>
Digipurpurogénine	digitoxose	digipurpurine
Diginigénine	diginose	diginine
Digifologénine	diginose	digifoléine

III.1.5 Dérivés du prégnane, précurseurs des cardénolides

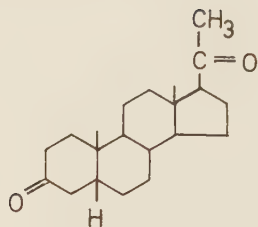
1) Prégnénolone (Δ^5 -prégnénol-3 β -one-20)



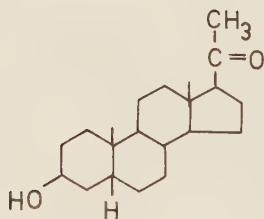
2) Progestérone (Δ^4 -prégnénedione-3,20)



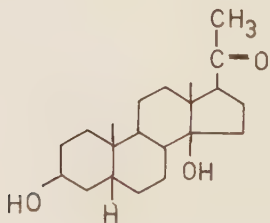
3) 5 β -Prégnanedione-3,20



4) 5 β -Pregnanol-3 β -one-20



5) 5 β -Pregnanediol-3 β ,14 β -one-20



III.2 Schémas de biosynthèse

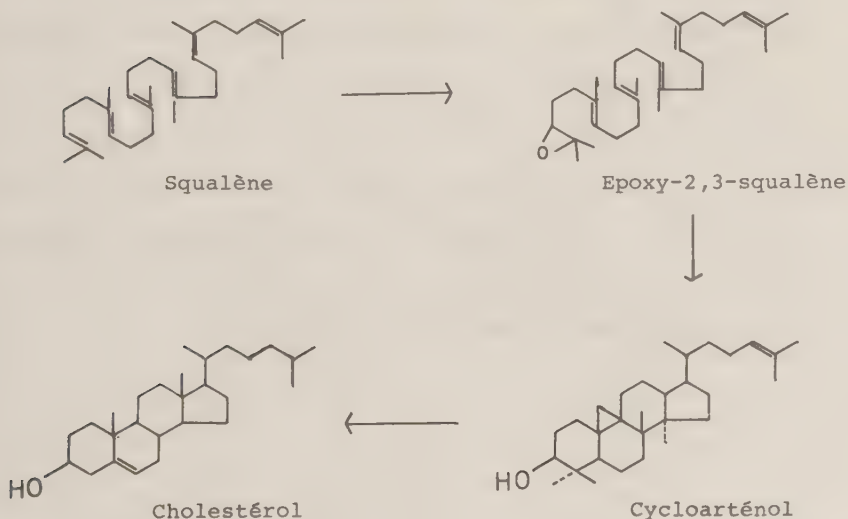
Cholestérol et cycloarténol :

Le cycloarténol et le cholestérol occupent une position clé dans la biosynthèse des autres phytostérols, des sapogénines, des hétérosides cardiotoniques et des digitanol-hétérosides.

Les principales étapes de leur biosynthèse sont les suivantes :

Acétate $\longrightarrow$ acétyl-CoA $\longrightarrow$ acide mévalonique $\longrightarrow$ acide 5 phosphomévalonique $\longrightarrow$ 3-isopenténylpyrophosphate $\longrightarrow$ géranylpyrophosphate $\longrightarrow$ farnésylpyrophosphate $\longrightarrow$ squalène $\longrightarrow$ époxy-2,3-squalène $\longrightarrow$ cycloarténol $\longrightarrow$ cholestérol. (Fig. 1).

Figure 1



Phytostérols :

Dans la littérature chimique moderne, le terme "phytostérol" concerne principalement les déméthyl-4,4'-stérols. Le précurseur est le cycloarténol.

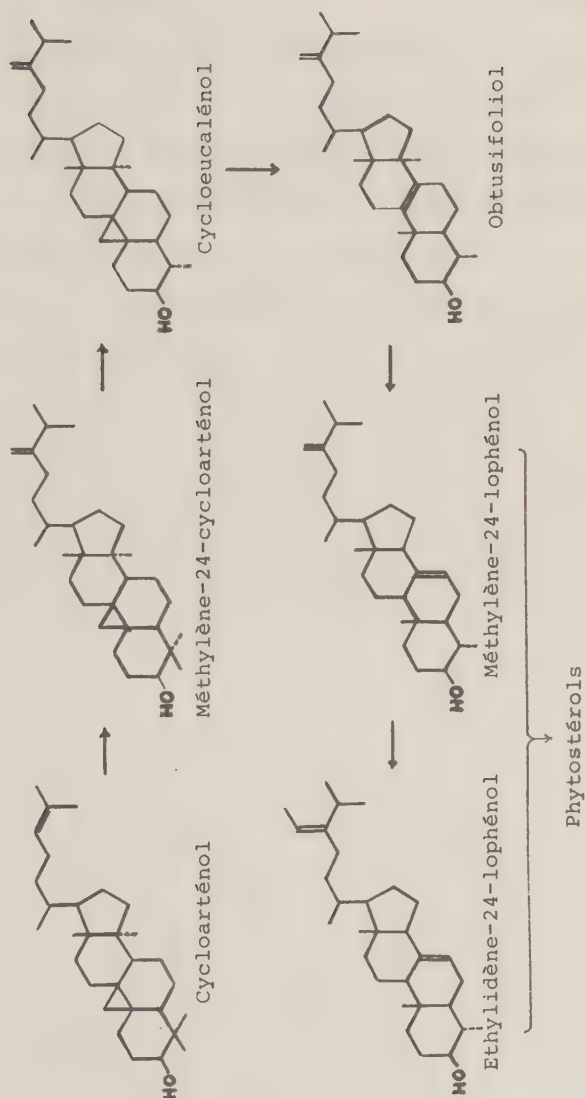
A l'exception du cholestérol et du Δ^7 -cholestérol, ces composés possèdent tous une chaîne latérale méthylée ou éthylée. Le schéma de leur biosynthèse^{76,77,78} qui passe par la méthylation en C-24 de la chaîne latérale du cycloarténol, suivie de la déméthylation en C-4 et de l'ouverture du cycle cyclopropanique en C 9,19 est représenté dans la figure 2.

Le méthylène-24-lophénol peut, soit subir une nouvelle déméthylation en C-4 pour donner naissance aux stérols en C-28 (campestérol, méthylène-24-cholestérol, etc.), soit subir une nouvelle alkylation en C-28 et former ensuite les déméthyl-4-stérols en C-29 (β -sitostérol, fucostérol, stigmastérol, etc.).

Il faut relever toutefois que l'ordre dans lequel les réactions de méthylation, de déméthylation et de réarrangement de la double liaison ont lieu, est incertain et varie probablement d'une espèce botanique à l'autre.

Figure 2

Schéma de biosynthèse des stérols dans les plantes supérieures

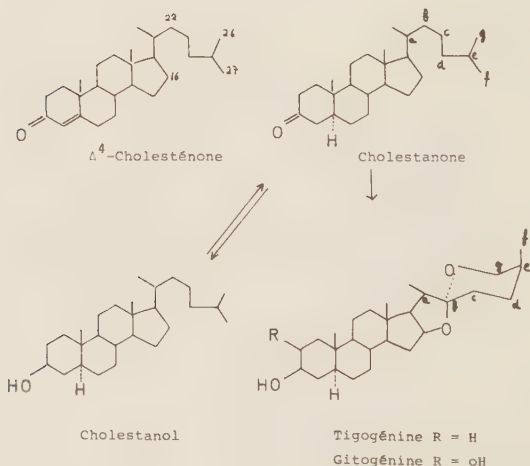


Sapogénines :

Leur biosynthèse a fait l'objet de relativement peu de travaux, fait étonnant si l'on considère leur importance actuelle dans la préparation semi-biologique des hormones corticoïdes et des hormones sexuelles.

Le précurseur des sapogénines est le cholestérol. Ce sont principalement les travaux de Joly⁷⁹, Varma⁸⁰ et Tschesche⁸¹⁻⁸⁴, et de leurs collaborateurs, qui ont démontré que le cholestérol est transformé en Δ^4 -cholesténone, que ce composé se transforme ensuite aussi bien en cholestanone qu'en cholestanol, que ces 2 métabolites se transforment réversiblement l'un dans l'autre et qu'ils sont tous deux transformés en tigogénine et en gitogénine par hydroxylation en C-16 et C-26 (fig. 3).

Figure 3



Hétérosides cardiotoniques :

Le schéma suivant de biosynthèse est généralement admis⁸⁵⁻⁸⁷ :

cholestérol $\rightarrow$ hydroxy-20 α -cholestérol $\rightarrow$ Δ^5 -prégnénol-3 β -one-20
progestérone $\rightarrow$ 5 β -prégnanol-3 β -one-20 $\rightarrow$ 5 β -prégnanediol-3 β ,14 β -one-20
5 β -prégnanetriol-3 β ,14 β ,21-one-20 $\rightarrow$ digitoxigénine (cf.Ch.III.1.5).

La biosynthèse des hétérosides cardiotoniques passe donc par la scission de la chaîne latérale du cholestérol, entre C-20 et C-22⁸⁸.

Des travaux de *Bennett et coll.*⁸⁹ ont démontré que le β -sitostérol joue également un rôle de précurseur et qu'il peut être métabolisé dans les feuilles de *Digitalis lanata* en progestérone, digitoxigénine, gitoxigénine et digoxigénine.

IV. Réalisation des cultures en milieu solide

Toute culture comprend 2 stades : le prélèvement et le repiquage. Le premier consiste à prélever un fragment de plante et à le placer dans un milieu nutritif favorable à la multiplication des cellules : c'est l'ensemencement primaire. L'explantat s'accroît pour donner des protubérances parenchymateuses, appelées cals. Dans une seconde opération, on isole des fragments de ces cals et on les transporte dans des milieux neufs. Les tissus ainsi repiqués s'accroissent à leur tour et peuvent au bout de quelques temps remplir le récipient de culture, épuiser le milieu ou former une masse telle qu'ils ne peuvent plus respirer, ni assimiler efficacement les matières nutritives mises à leur disposition. La culture ne peut donc être entretenue que par des repiquages réguliers. On appelle passage la période qui sépare deux repiquages successifs.

IV.1 Les milieux nutritifs

IV.1.1 Généralités

Les exigences nutritives des cultures de tissus varient largement d'une espèce végétale à l'autre; on peut toutefois déceler certaines exigences de caractère général.

Les constituants de base de tout milieu nutritif

sont un mélange de sels minéraux, composé lui-même d'éléments essentiels et d'un certain nombre de microéléments, et une source organique de carbone.

Les éléments essentiels sont l'azote, le magnésium, le phosphore, le potassium et le calcium, alors que les microéléments ou oligoéléments sont le fer, le manganèse, le zinc, le molybdène, le bore, l'iode, le cuivre et le cobalt.

Alors que les plantes intactes sont autotrophes, c'est-à-dire capables d'opérer la synthèse de tous leurs constituants organiques à partir du gaz carbonique, de l'oxygène, de l'azote et des éléments minéraux, les tissus cultivés *in vitro* ne possèdent pas cette faculté; ils ont besoin d'un apport de carbone organique, qui est fourni généralement par l'introduction d'un sucre dans le milieu nutritif.

Il existe cependant fort peu de tissus végétaux qui peuvent être maintenus en vie sur un milieu aussi simple. Pour la majorité des tissus, des additifs sont nécessaires. Les plus courants sont les vitamines, les acides aminés, les auxines, la kinétine ou d'autres cytokinines et différents extraits naturels comme le lait de coco, l'extrait de levure ou l'hydrolysate de caséine.

Plusieurs chercheurs ont mis au point des milieux de culture qui ont trouvé de multiples utilisations; parmi eux on peut citer : *Heller*⁹⁰ (1953), *Murashige* et *Skoog*⁹¹ (1962),

White⁹² (1963), Gamburg⁹³ (1968), Nitsch et Nitsch⁹⁴ (1969), Schenk et Hildebrandt⁹⁵ (1972). Il a toutefois été démontré⁹⁵ que certains de ces milieux induisent une excellente croissance des tissus de certaines espèces, mais se montrent d'une efficacité très faible voire nulle vis-à-vis d'autres espèces.

Les milieux solides contiennent encore de l'agar, à raison de 0,6 à 1%, comme gélifiant. Pour des travaux nécessitant un milieu parfaitement défini, on a avantage à utiliser de l'agar de pureté contrôlée.

La pureté de l'eau utilisée pour la préparation des milieux, est un facteur très important pour la réussite des cultures. Il est donc nécessaire de la distiller deux fois ou même de la distiller sur permanganate de potassium alcalin, pour éliminer toute trace de substances organiques.

IV.1.2 Importance des différents constituants. Considérations théoriques

Les expériences et constatations que nous évoquons dans ce chapitre proviennent aussi bien de travaux relatifs à la culture en milieu solide que de travaux traitant des suspensions de cellules. Un nombre important de publications traite simultanément de ces deux types de culture. Cependant, les inconvénients inhérents à la culture sur milieu solide (cf. chap. II), ont fait que la plupart des travaux récents sur la nutrition, le métabolisme ou la croissance ont été réalisés avec des milieux liquides³⁸.

Nous nous permettons de rappeler ici les constatations de *Torrey* et *Reinert*¹²⁴ : les besoins nutritifs des cellules de différentes plantes supérieures cultivées en suspension sont souvent différents et plus complexes que ceux des tissus cultivés en agrégats multicellulaires sur milieu solide; ce phénomène pourrait s'expliquer par une interaction des cellules en contact étroit.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons examiner de façon plus détaillée les différentes catégories de constituants :

- les sels minéraux : Les principaux sels sont ceux de potassium, de calcium, de magnésium et les phosphates.

Schenk et *Hildebrandt*⁹⁵ ont établi les concentrations optimales de ces sels pour la culture des cals de monocotylédones et de dicotylédones. Des concentrations élevées aboutissent à la formation de précipités et au ralentissement de la croissance.

En revanche, *Gamborg* et coll.⁹³ n'ont pas observé de différences dans la croissance des cultures (suspensions de cellules de Soja) en faisant varier dans certaines limites les concentrations de calcium, de magnésium et de phosphate.

Murashige et *Skoog*⁹¹, utilisant le milieu de *White* modifié comme point de départ pour leurs essais, ont obtenu une forte augmentation de la croissance des tissus de Tabac en éle-

vant les concentrations d'azote à 50 mmoles/l, de potassium à 15 mmoles/l et de phosphore à 1 mmole/l. Ils pensent que les besoins en azote sont indépendants de la concentration des autres éléments, tandis que les besoins en potassium et en phosphore leur semblent fortement interdépendants.

Le fer, généralement utilisé sous forme de chélate, stimule la croissance^{91,95}.

Le manganèse, le bore, le zinc, le molybdène, l'iode et le cuivre ont un effet stimulant selon *Schenk et coll.*⁹⁵, alors que l'effet du cobalt demeure obscur. Pour *Murashige et Skoog*⁹¹ par contre, tous ces éléments y compris le cobalt et le sodium n'ont aucun effet sur la croissance des tissus (cals) de Tabac; ils les introduisent néanmoins dans leur milieu. Ces auteurs justifient la présence de cuivre et de molybdène par le fait que ces deux éléments sont reconnus comme étant essentiels à la croissance des plantes; ils justifient l'adjonction de cobalt par son rôle probable dans la morphogénèse des plantes supérieures.

Il faut relever encore que *Tsao et coll.*⁹⁷, dans une étude sur la plante entière de *Digitalis purpurea*, ont mis en évidence une inhibition marquée de la production d'hétérosides par le cobalt.

- L'azote : Il peut être d'origine organique : acides aminés, amides, hydrolysats de caséine, extrait de levure etc... ou

d'origine minérale : sels d'ammonium ou nitrates.

De nombreux milieux synthétiques contiennent différentes combinaisons d'acides aminés comme stimulants de la croissance^{96,98}.

*Torrey et coll.*⁹⁹ (1957) ont d'abord pensé que l'extrait de levure est indispensable au développement des cals de Pois; puis, ils ont réussi à le remplacer avantageusement par de l'azote organique sous forme d'urée ou d'asparagine et même finalement par de l'azote inorganique, p.ex. sous forme de chlorure d'ammonium.

*Murashige et Skoog*⁹¹ (1962) ont retenu dans leur formule le glycolle (2 ppm) sans toutefois en contrôler l'utilité. Quelques années plus tard, *Linsmaier et Skoog*¹⁰⁰, travaillant également sur des cals de Tabac, n'ont noté aucun effet bénéfique dû au glycolle ou à l'acide glutamique aux concentrations usuelles.

*Eriksson*¹⁰¹ (1965) enfin, a observé de son côté que l'azote organique (acide glutamique, acide aspartique, arginine ou cystéine) n'était pas nécessaire à la croissance des cultures de cellules de *Haplopappus gracilis*.

Ces résultats ont été confirmés par *Gamborg et coll.*⁹³, dans le cas des cultures en suspension de Soja. Après avoir comparé la glutamine, un hydrolysât pancréatique de caséine, différentes combinaisons d'acides aminés et le sulfate

d'ammonium, ces auteurs ont constaté que c'est le sel minéral qui constitue la meilleure source d'azote, à condition d'être utilisé à la concentration de 2 mmol/l et en présence de 25 mmol/l de nitrate.

- Les extraits naturels : L'hydrolysate de caséine^{91,93,95}, le lait de coco⁹³ et l'extrait de levure⁹⁹ sont généralement reconnus comme stimulants de la croissance. Cependant, certaines expériences prouvent le contraire : l'hydrolysate de caséine, par exemple, inhibe complètement le développement des graines germées de Digitalis¹⁰² et empêche également la croissance des callus de Tabac en absence de kinétine et d'auxine¹⁰³. De même, le lait de coco ne stimule la formation et le développement des callus de Menthe qu'en présence d'acide dichloro-2,4-phénoxyacétique¹⁰⁴.

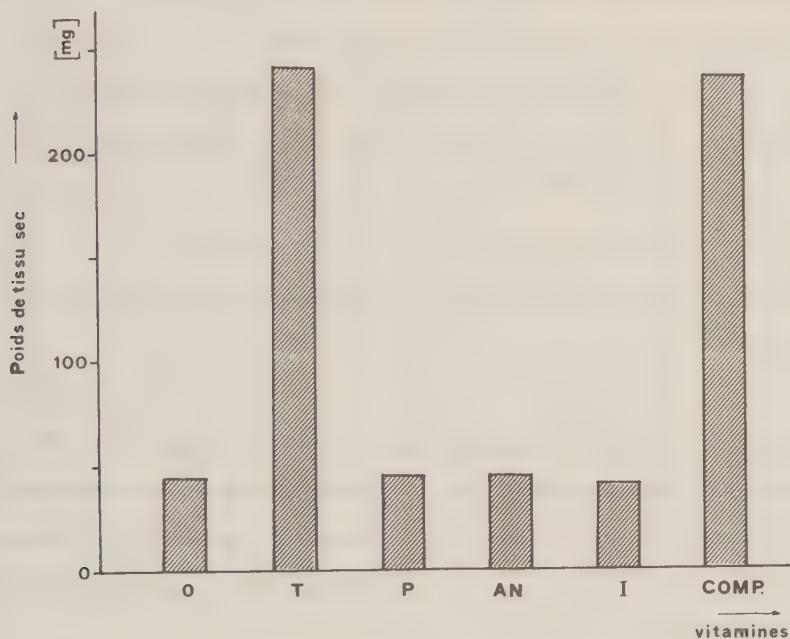
Le principal inconvénient de ces extraits naturels réside dans leur composition mal définie et peu constante. La concentration optimale du lait de coco, par exemple, varie avec les différents lots de noix utilisés¹⁰⁵. C'est pourquoi on tend actuellement à supprimer ces constituants et à les remplacer par d'autres facteurs de croissance bien définis chimiquement. Comme nous l'avons vu plus haut, certains extraits peuvent être remplacés avantageusement par des mélanges d'acides aminés, ou même par de l'azote inorganique.

- Les vitamines : Les principales vitamines utilisées sont : la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine, l'acide folique, l'acide p-aminobenzoïque, le pantothénate de calcium, l'acide nicotinique et la biotine.

Figure 4

Besoins en vitamines de cultures de cellules de Soja.

Valeurs obtenues après 11 jours de culture (d'après Gamborg⁹³).



O : absence de vitamines
T : thiamine HCl (10 mg/l de milieu nutritif)
P : pyridoxine (1 " " " ")
AN : acide nicotinique (1 " " " ")
I : myoinositol (100 " " " ")
COMP : mélange des 4 vitamines, aux concentrations indiquées ci-dessus.

Des essais de culture de cellules en absence totale de vitamines^{93,96} ont abouti à un arrêt rapide de la croissance. Cependant, malgré la présence de tout un assortiment de vitamines dans certains milieux de culture^{104,106}, des études spécifiques^{93,100,101} ont démontré que la thiamine est la seule vitamine essentielle pour le développement (fig. 4). La pyridoxine, l'acide nicotinique, l'acide p-aminobenzoïque et l'acide folique ont un effet positif plus ou moins prononcé selon l'origine botanique de la culture.

Quant au myoinositol, il semble être utile pour un développement rapide des cals, sans être indispensable à la croissance^{95,100,101}.

Linsmaier et coll.¹⁰⁰ ont mis en évidence un effet inhibiteur de la riboflavine à toutes les concentrations étudiées.

- Les auxines et les cytokinines : Peu de tissus végétaux sont capables de produire un cal sans adjonction de facteurs de croissance dans le milieu nutritif. Certains tissus ne nécessitent qu'une auxine ou une cytokinine, d'autres nécessitent les deux simultanément.

Ces facteurs de croissance permettent d'induire la formation de cals, de stimuler la division cellulaire et d'éviter une différenciation des tissus, ou au contraire de stimuler une organogénèse.

On dispose de très nombreuses informations sur les effets de ces substances, mais leur mécanisme d'action n'est pas encore élucidé³⁸. Le choix d'un ou de plusieurs facteurs de croissance et de leur concentration dans le milieu de culture, se fait sur la base de données strictement expérimentales.

Les auxines normalement utilisées dans les cultures de tissus sont :

- l'acide naphtyl-2-acétique (NAA)
- l'acide dichloro-2,4-phénoxyacétique (2,4-D)
- l'acide indolyl-3-acétique (IAA)
- l'acide benzothiazolyl-2-acétique (BTOA).

Le 2,4-D seul ou en association avec d'autres auxines (NAA ou BTOA^{102,104}) ou avec de la kinétine, est souvent l'auxine la plus efficace pour induire la formation de cals^{99,104,106}, stimuler la division cellulaire^{57,93,99} et empêcher une différenciation ultérieure^{57,91,95}. Il est également reconnu comme un stimulant de la dissociation des tissus⁹⁶, ce qui le rend particulièrement utile pour les cultures de cellules en milieu liquide.

Dans les cultures en suspension de Digitale pourpre, *Pilgrim*¹⁰⁷ a constaté que la présence de 2,4-D est une nécessité absolue pour la survie des cultures; selon cet auteur, l'association de kinétine avec d'autres auxines (IAA ou NAA) s'est révélée insuffisante. Dans certains cas cependant¹⁰⁸, le

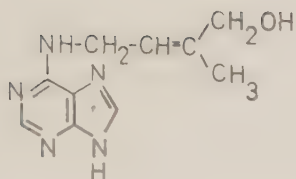
rendement en tissus secs est supérieur en absence de 2,4-D. D'autre part, les concentrations élevées de 2,4-D (5 ppm et plus) inhibent complètement la croissance^{38,102}.

Le 2,4-D présente le grand inconvénient de favoriser l'apparition d'aberrations chromosomiques^{109,110}, c'est pourquoi de nombreux chercheurs évitent son emploi et cherchent à le remplacer par d'autres auxines.

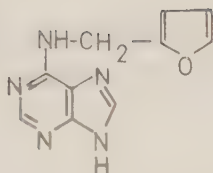
Dans certains cas, le IAA stimule fortement la croissance des cultures (en suspension ou sur milieu solide), seul¹⁰¹ ou associé à la kinétine^{91,100}. Dans d'autres cas, il s'est montré peu efficace^{99,104}, ou même totalement dépourvu d'effets⁹³. Des observations analogues ont été faites avec le NAA (stimulation¹⁰¹, effet faible^{99,104,107} ou nul⁹³).

Le BTOA, d'un usage moins courant, induit également la formation de cals, seul¹⁰⁴ ou en association avec le 2,4-D^{102,104}.

Les cytokinines sont, par définition, des substances naturelles que l'on peut isoler à partir d'extraits de plantes vertes³⁸, par exemple la zéatine. Il existe actuellement plusieurs produits naturels ou de synthèse qui possèdent les propriétés des cytokinines dont la kinétine, qui est utilisée le plus largement dans les cultures de tissus.



zéatine



kinétine

Son action est extrêmement complexe, et on est loin d'avoir mis en évidence tous les mécanismes biochimiques dans lesquels elle intervient. Nous ne donnerons qu'un seul exemple, celui des cultures de tissus de Tabac : la kinétine modifie la composition des parois cellulaires¹¹¹ et elle influence la synthèse de la scopoline¹¹².

Du point de vue du développement des tissus, les résultats obtenus avec la kinétine sont souvent contradictoires. Pour *Gamborg et coll.*⁹³, elle est inutile et inhibe la croissance des tissus même à très faible concentration. Pour *Eriksson*¹⁰¹, elle inhibe la croissance et diminue la dissociation des cellules, mais elle a un effet favorable sur la vigueur des cellules. Pour *Schenk et coll.*⁹⁵, elle est nécessaire à faible concentration pour le développement de la plupart des cultures de cellules de dicotylédones. Notons, enfin, que dans les cultures de cals de Tabac, la kinétine peut rem-

placer la thiamine. En effet, en présence de kinétine à haute dose, les cellules de Tabac synthétisent cette vitamine^{113,114}.

La kinétine est très souvent utilisée en association avec une ou plusieurs auxines.

- Les sucres : Le saccharose est généralement la source de carbone la plus satisfaisante^{91,93,101}. Les autres sucres ne sont que partiellement utilisés par les tissus. Le glucose fait exception, mais il pose des problèmes lors de l'autoclavage des milieux⁹⁵.

La concentration optimale de saccharose se situe entre 2%⁹³ et 3%⁹⁵. Une concentration égale ou supérieure à 4%, peut diminuer le rendement en poids sec^{91,95}.

- Le pH : La plupart des milieux de base sont tamponnés et ont un pH initial légèrement inférieur à 7 (5 à 6). Ce pH maintient tous les sels en solution⁹¹. Selon Gamborg⁹³, le meilleur rendement des cultures de cellules de Soja est obtenu avec un pH initial de 4,5 à 5,5.

Le pH a tendance à augmenter au cours d'un passage, et tend vers 7.

La teneur élevée en phosphates de certains milieux^{95,101}, suffit à les tamponner aux environs de pH = 6 et permet d'éviter l'emploi d'autres substances-tampon qui ne sont pas toujours favorables à la croissance des tissus.

Tableau 1

Milieu de culture selon T. Murashige et F. Skoog,
modifié par J. Staba et S. Lamba¹⁰⁶ (abrégé en MS)

I. Sels minéraux

	Sels ^{a)}	mg/l	mmoles/l	Sol. mère (g/l)	ml de sol. mère / l l de milieu
A	NH ₄ NO ₃	1650,0	20,6	82,5	20
B	KNO ₃	1900,0	18,8	95,0	20
C	H ₃ BO ₃	6,2	0,100	1,24	5
	KH ₂ PO ₄	170,0	1,25	34,00	
	KI	0,83	0,005	0,166	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,001	0,050	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0001	0,005	
D	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0	2,9	88,0	5
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	1,5	74,0	5
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	0,100	3,38	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,030	1,72	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0001	0,005	
F*	Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	37,3	0,1	4,13	10
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	0,1	2,78	

* Préparation de la solution mère : FeSO₄·7H₂O est dissous dans environ 200 ml d'eau distillée. Na₂·EDTA est également dissous dans un même volume d'eau, chauffé et mélangé, tout en agitant, à la solution de FeSO₄. Après refroidissement, le volume est complété à 1000 ml. Chauffage et agitation facilitent la formation du complexe Fe.EDTA.

a) E. Merck, qualité "p.a."

Tableau 1 (suite)

II. Constituants organiques

	mg/. (=ppm)	Sol.mère (mg/100 ml)	Solvant	ml de sol. mère /l l de milieu
1. Glycocolle ^{a)}	2	200	H ₂ O	1
2. Acide nicotinique ^{a)}	2	200	H ₂ O	1
3. Biotine ^{a)}	1	50	EtOH 95%	2
4. Choline, HCl ^{b)}	1	100	H ₂ O	1
5. Pantothénate de calcium ^{a)}	1	100	H ₂ O	1
6. Pyridoxine, HCl ^{a)}	1	100	H ₂ O	1
7. Thiamine, HCl ^{a)}	1	100	H ₂ O	1
8. Acide p-amino-benzoïque ^{a)}	0,5	50	H ₂ O	1
9. Riboflavine ^{a)}	0,5	10	H ₂ O	5
10. Acide folique ^{a)}	0,5	50	NaOH 0,1N	1
Auxine : 2,4 - D ^{b)}	1	100	EtOH 95%	1
Cytokinine : kinétine ^{b)}	0 - 2	50	NaOH 0,1N	
Saccharose ^{a)} : 20,0 g / l Myoinositol ^{a)} : 5,0 g / l Agar ^{c)} : 7,0 g / l pH : environ 6 (ajusté avec KOH ou HCl en solution diluée).				

a) E. Merck, qualité "p.a.".

b) Sigma Chemical Company.

c) Bacto-Agar Difco.

Tableau 2

Milieu de culture selon R.U. Schenk et A.C. Hildebrandt⁹⁵

(abrégé en SH)

I. Sels minéraux

	Sels ^{a)}	mg/ℓ (=ppm)	mmoles/ℓ ou μmoles/ℓ	Sol.mère (mg /ℓ)	ml de sol. mère /1 ℓ de milieu
A	KNO ₃	2500	24,72 mmoles	50000	50
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	400	1,62 "	8000	
	NH ₄ H ₂ PO ₄	300	2,61 "	6000	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	200	1,36 "	4000	
B	MnSO ₄ ·H ₂ O	10,0	59,2 μmoles	200	50
	H ₃ BO ₃	5,0	80,9 "	100	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,0	3,5 "	20	
	KI	1,0	6,0 "	20	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2	0,8 "	4	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1	0,4 "	2	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,4 "	2	
C*	FeSO ₄ ·7H ₂ O	15	54,0 μmoles	15000	1
	Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	22	59,1 "	22000	

* Préparation de la solution mère : cf. milieu MS

a) Qualité "p.a.", E. Merck.

Tableau 2 (suite)

II. Constituants organiques

	mg/l (= ppm)	Sol.mère (mg/100ml)	ml de sol. mère /1 l de milieu
* Thiamine, HCl ^{a)}	5	500	1
Acide nicotinique ^{a)}	5	500	
Pyridoxine, HCl ^{a)}	0,5	50	
Auxines :			
2,4-D ^{b)}	0,5	cf. milieu MS	
** pCPA	2,0		
Cytokinine :			
kinétine ^{b)}	0,1	cf. milieu MS	
Saccharose ^{a)} : 30,0 g/l			
Myoinositol ^{a)} : 1,0 g/l			
Agar ^{c)} : 7,0 g/l			
pH : 5,9			

* Préparation de la solution mère : par dissolution dans du KOH 0,1N.

** Acide p-chlorophénoxyacétique

a) qualité "p.a.", E. Merck.

b) Sigma Chemical Company.

c) Bacto-Agar Difco.

IV.1.3 Composition des milieux utilisés

Les formules exactes des milieux de *Murashige* et *Skoog* (modifié par *Staba* et *Lamba*) et de *Schenk* et *Hildebrandt*, figurent dans les tableaux Nos 1 et 2.

IV.1.4 Technique de préparation

Afin de simplifier et d'accélérer les opérations, on prépare à l'avance des solutions concentrées (solutions-mères) de sels minéraux, de vitamines, d'acides aminés, d'auxine et de kinétine. Le plus grand soin est apporté à la pesée des substances et à la mesure des volumes.

Toutes les solutions sont conservées à 4°C à l'exception des solutions d'auxine et de kinétine qui sont conservées au congélateur à -20°C.

Le jour de la préparation, on dissout l'agar par chauffage dans de l'eau bidistillée; on ajoute ensuite avec grande précision les différentes solutions mères, le saccharose et le myoinositol et on complète au volume choisi avec de l'eau bidistillée. On agite vigoureusement pour assurer une parfaite homogénéité du milieu.

On ajuste le pH du milieu MS à 6 avec une solution diluée de KOH ou HCl. Le milieu SH est tamponné à un pH de 5,9 par les phosphates.

Le milieu est ensuite réparti dans des tubes en verre pyrex (160 mm x 30 mm de Ø ext.), à raison de 30 ml par tube, puis stérilisé à l'autoclave, 20 minutes à 120°.

Le milieu est préparé 1 jour ou au maximum 2 jours avant son utilisation.

Tous les tubes, ainsi que toute la verrerie utilisée pour la préparation des milieux, sont lavés avec un détergent, rincés plusieurs fois à l'eau bouillante, puis avec une solution à 10% d'acide citrique pour éliminer les restes de détergent; ils sont enfin rincés au minimum six fois avec de l'eau déminéralisée. Il est important que toute la verrerie soit dépourvue de toute substance qui pourrait intervenir d'une façon ou d'une autre dans le développement des cultures.

IV.2 Etablissement de la culture

IV.2.1 Choix des tissus initiaux

Des tissus de différentes parties de la plante peuvent être mis en culture et produire des cals : le tissu cambial, les tissus parenchymateux, le péricycle des racines, l'albumen, les cotylédons, le mésophylle, etc.³⁸.

Du point de vue du métabolisme, il ne semble pas que des cellules tirant leur origine de racines ou de parties aériennes soient différentes¹¹⁵.

En vue de la production de métabolites secondaires, il serait logique, à première vue, de choisir comme tissus initiaux ceux qui sont les sites principaux de la biosynthèse dans la plante entière. D'un autre côté, il est bien connu que les cellules de cals sont totipotentes, c'est-à-dire qu'elles possèdent toute l'information génétique nécessaire à la synthèse de l'ensemble des métabolites de la plante entière⁶¹. Il est donc en principe sans importance de quel organe on prélève les explantats primitifs.

Les résultats obtenus avec des cultures de Solanacées semblent confirmer les deux points de vue ci-dessus. Les sites principaux de biosynthèse des alcaloïdes du tropane sont les racines. Alors que certains chercheurs trouvent des alcaloïdes dans les tissus indifférenciés issus de racines, de tiges, de feuilles et de graines^{53, 116}, d'autres n'en trouvent que dans les tissus indifférenciés provenant de racines⁴⁹.

Ces résultats nous ont incité à mettre en culture des tissus de différents organes de *Digitalis purpurea* : tiges, feuilles et plantules.

Les feuilles et les plantules ont été obtenues par germination et culture de graines de *Digitalis purpurea*^{a)} dans notre laboratoire.

a) Nous tenons à remercier Monsieur le Dr B. Siegfried, d'avoir aimablement mis à notre disposition des graines de *Digitalis purpurea*.

La culture dans notre serre n'ayant pas donné lieu à la formation d'une tige et de fleurs, nous avons dû utiliser des tiges provenant de plantes cultivées au Jardin Botanique de Genève et récoltées au milieu du mois de juin.

Quant aux tissus de racine, nous avons dû renoncer à les cultiver : en effet les racines de *Digitalis purpurea* sont extrêmement fines et n'ont pas supporté les traitements que nécessite la stérilisation précédant la culture (cf. chap. IV.2.2).

IV.2.2 Préparation des tissus stériles

A quelques rares exceptions près, tous les tissus végétaux sont contaminés par de nombreux micro-organismes. Si on néglige d'éliminer tous ces micro-organismes, ils se développeront dès qu'ils seront mis en contact avec le milieu de culture et entraveront sérieusement le développement des cals. C'est pourquoi une asepsie parfaite est nécessaire.

Avant de procéder à l'ensemencement primaire, il faut donc s'assurer que les tissus choisis sont parfaitement stériles.

Il y a deux moyens d'obtenir des tissus stériles :

- 1) la culture de la plante en milieu stérile, puis le prélèvement aseptique des tissus sélectionnés pour la culture.
- 2) la stérilisation de la plante ou d'une partie de la plante.

Nous avons adopté la première méthode après stérilisation des graines, pour l'obtention de plantules, puis de feuilles stériles, et la deuxième méthode pour l'obtention de tiges stériles.

Il existe une grande variété d'agents chimiques permettant la stérilisation de surface du matériel végétal*. Le choix de l'agent et du temps de traitement dépend de la sensibilité du matériel à traiter; une stérilisation trop poussée risque d'être mortelle pour la plante. Il est donc essentiel de déterminer les conditions optimales pour chaque tissu.

C'est ce que nous avons fait pour la stérilisation des graines et des tiges, en essayant différents désinfectants (hypochlorite de calcium ou de sodium, borate de phénylmercure, chloramine-T, chlorhexidine, Désogène[®], chlorure de mercure-II) et en variant le temps de contact avec les tissus

* Des antibiotiques ont été utilisés occasionnellement¹¹⁷, mais ils présentent le danger d'inhiber à leur tour la croissance des tissus, et de ne pas éliminer tous les micro-organismes.

à désinfecter.

En ce qui concerne la stérilisation des tiges, nous avons finalement adopté les conditions suivantes : les tiges sont coupées en segments de 15 à 20 cm de long et placées pendant 30 minutes dans un cylindre contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 25%. Elles sont ensuite rincées deux fois pendant 30 minutes dans de l'eau stérile.

La stérilisation des graines a été plus difficile à réaliser : en effet les graines de *Digitalis purpurea* sont très petites (dimension d'une tête d'épingle) et leur tégument a une structure alvéolée. De plus, lorsqu'on essaie de les immerger dans une solution aqueuse, elles surnagent et n'entrent que partiellement en contact avec le désinfectant. L'utilisation des désinfectants cités dans la littérature, comme la chloramine-T¹¹⁸ (sol. aqueuse à 10%), l'hypochlorite de sodium^{56,60,102,167} (sol. aqueuse à différentes concentrations), ne nous a pas permis d'obtenir une stérilisation suffisante^{a)}.

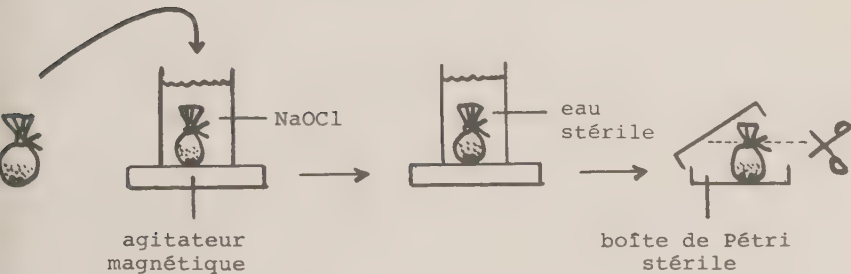
Nous avons pensé que la mauvaise stérilisation provenait du fait que l'agent chimique ne pénétrait pas dans toutes les anfractuosités du tégument. Nous avons donc essayé deux techniques citées par *Street*³⁸, en ajoutant au désin-

a) La stérilité est testée par ensemencement de boîtes de Pétris contenant de l'Antibiotic Medium B de *Difco* et incubation pendant plusieurs jours à 26°.

fectant un agent tensio-actif (*Tween*) ou en rinçant rapidement les graines avec de l'éthanol à 90%, avant de les désinfecter. Presque toutes les graines traitées selon l'une ou l'autre de ces deux méthodes ont dépéri. Nous avons donc été amenés à chercher un système assurant un bon contact entre l'agent chimique et toute la surface du tégument, sans avoir à recourir à un agent mouillant : les graines sont placées avec quelques billes de verre dans un petit morceau de tulle de nylon que l'on replie et ferme avec un petit bout de fil de fer; ce petit sac est alors déposé dans un bécher contenant une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 25%. Le contenu du bécher est alors agité au moyen d'un agitateur magnétique pendant 40 minutes.

Figure 5

Stérilisation des graines



Le petit sac est transféré aseptiquement dans un autre b cher contenant de l'eau stérile et se trouvant dans une enceinte de flux d'air laminaire^{a)} et agité pendant 20 minutes. Ce rinçage est renouvelé trois fois pendant 10 minutes. Le sac est alors déposé dans une boîte de Pétri stérile, sa partie supérieure est coupée au moyen de ciseaux stériles, et les graines sont libérées (Fig. 5).

Germination aseptique :

Les graines sont mises à germer aseptiquement   26^o, à raison de 3 ou 4 graines à la fois sur du papier filtre imprégné d'eau et se trouvant dans les tubes de verre que l'on utilisera par la suite pour la culture des cals ($\emptyset$ ext. 30mm), fermés par des couvercles m talliques^{b)} qui protègent la culture contre les infections, mais permettent les échanges gazeux (Fig. 6).

Les graines commencent à germer au bout de trois jours. Après dix jours, les jeunes plantules atteignent une longueur de 0,5   1 cm et portent 2 feuilles. Une partie de ces plantules sera utilisée telle quelle pour la mise en culture et la formation des cals, tandis que l'autre partie est transportée dans de nouveaux tubes contenant une solution à 1,5% de Bacto Nutritient Agar de *Difco* qui leur permettra de continuer à se développer.

a) *M caplex A.G.*, Grenchen.

b) Cap-o-test.

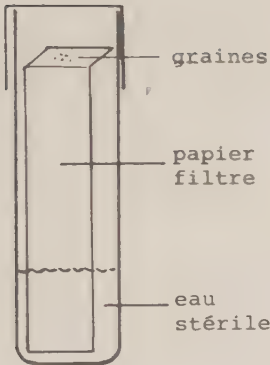


Figure 6
*Technique utilisée
pour la germination
des graines*

A l'âge de 6 semaines, ces plantes ont l'aspect d'une rosette formée de 5 à 8 feuilles et possèdent de petites racines. Les feuilles ont alors des dimensions suffisantes (de 0,5 à 1 cm de large et de 1 à 2,5cm de long) pour être utilisées pour la mise en culture.

IV.2.3 Préparation des explantats primaires et ensemencement

L'induction d'une callogenèse se fait lorsque l'explantat stérile est mis en contact avec un milieu nutritif qui est capable d'induire la division cellulaire. On appelle explantat un segment d'un organe de plante. L'explantat peut être formé d'un seul type de cellules (p.ex. phloème secondaire) ou de plusieurs types (p.ex. tissus de feuilles, racines, tiges).

Les cals formés dans le deuxième cas peuvent être très hétérogènes. Il faut cependant noter que même dans un tissu dont les cellules semblent être uniformes, il peut y avoir de grandes différences dans la composition du DNA du noyau de ces cellules³⁸, et les cals qui sont formés ne seront pas forcément homogènes.

Nos explantats sont formés de cellules originaires de différents tissus, en raison des dimensions restreintes des organes que nous avons utilisés comme matériel de départ.

Pour la préparation des explantats et pour les étapes suivantes de la culture de cals, nous avons suivi les principes de base qui figurent dans l'ouvrage de *Gautheret*¹¹⁹. Tous les travaux faisant intervenir les explantats ou les cals doivent se faire en milieu rigoureusement aseptique. Nous nous sommes servi à cet effet d'un appareil à flux d'air laminaire^{a)} qui offre une grande sécurité tout en facilitant les manipulations. D'autre part, tous les instruments utilisés ont été flambés avant usage et toute la verrerie a été stérilisée à l'autoclave (20 minutes à 120°). Les mains et les bras de l'opérateur sont désinfectés au Remanex[®] b) avant le début du travail.

a) *Mécaplex AG*, Grenchen.

b) *Zyma*, Nyon.

a) Explantats de tiges : On coupe les fragments de tiges stériles en segments de 1 cm de long, puis on en élimine les couches externes avec un scalpel. Les fragments de plus gros diamètre sont partagés en deux. La forme et la dimension des explantats est sans grande importance. Il est toutefois préférable de ne pas ensemençer des explantats trop petits, car la prolifération des cellules risque de ne pas avoir lieu. En général l'utilisation d'assez gros morceaux augmente les chances de réussite de la culture³⁸. Dans le cas des tiges (ou de racines), la présence de tissu cambial est un atout supplémentaire. Les segments de tiges sont ensuite placés à l'aide de longues pinces, dans des tubes contenant chacun environ 20 ml de milieu.

b) Plantules : Pour la réalisation des cultures, nous avons utilisé la méthode de Jagendorf & coll.¹²⁰, qui consiste à transporter les graines germées dans un milieu susceptible de provoquer la prolifération anarchique des tissus de racine, de tige et de feuille. Les plantules que nous avons utilisées étaient âgées de 10 jours et comportaient une tigelle de 5-10 mm de long et deux feuilles. Nous les avons transférées telles quelles dans les tubes contenant le milieu de culture.

c) Explantats de feuilles : Les plantes stériles sont placées dans une boîte de Pétri stérile et les feuilles sont découpées au scalpel : on prélève vers le centre de la feuille un fragment carré ou rectangulaire comprenant la nervure principale (dimension : 8-10 x 10-15 mm). On dépose cet explantat à plat sur la milieu de culture.

Récipients : Nous avons utilisé pour toutes les cultures en milieu solide des tubes en verre pyrex de 160 mm de hauteur sur 30 mm de diamètre extérieur, fermés par des bouchons métalliques^{a)} spécialement conçus pour la culture en milieu aseptique.

Milieu nutritif : Tous les ensemencements primaires ont été réalisés sur le milieu préconisé par *Murashige* et *Skoog*⁹¹ pour la culture des tissus de Tabac et modifié par *Staba* et *Lamba*¹⁰⁶ pour la culture des tissus de *Digitalis lanata* et *Digitalis purpurea*. Par la suite, ce milieu sera conventionnellement abrégé en MS. Ce milieu^{121,122} ou le milieu de *Murashige* et *Skoog*¹⁰⁴ modifié par *Lin* et *Staba*^{118,123}, sont couramment utilisés pour les cultures de tissus de Digitale.

La composition du premier milieu cité figure au chapitre précédent. Il contient les facteurs de croissance suivants :

a) Cap-o-test.

- auxines : tous les explantats ont été mis en culture sur le milieu contenant 1 ppm de 2,4 D.
- cytokinine : les explantats de tiges et la moitié des explantats de feuilles ont été mis en culture sur le milieu contenant 1 ppm de kinétine. Les plantules ont été mises en culture sur le milieu dépourvu de kinétine.

IV.2.4 Conditions de culture

Dans ce travail, notre but n'était pas d'étudier l'influence des facteurs tels que la température, la lumière ou l'humidité. C'est pourquoi nous avons adopté les conditions usuelles pour les cultures de Digitale pourpre et limité nos investigations dans ce domaine à un minimum.

- Température : La température optimum varie avec chaque type de culture. Nous avons réglé dès le début le thermostat de la salle de culture sur $26 \pm 1^{\circ}$, température généralement utilisée pour les cultures de tissus de Digitale pourpre^{121,123,124}.
- Humidité : Nous avons maintenu une humidité relative d'environ 60% afin d'éviter le dessèchement des milieux.

La température et l'humidité ont été enregistrées en permanence, ce qui nous a permis de remédier rapidement aux variations démesurées de ces 2 facteurs.

- Lumière : Certaines cultures de *Digitalis purpurea* ont été entretenues à la lumière¹²¹ et d'autres à l'obscurité^{118,124}.

Une étude approfondie sur les cals de Tabac¹²⁵ a fait ressortir que l'intensité de l'éclairement et la composition du spectre de la source lumineuse sont d'une grande importance, et agissent tous les deux sur la morphologie des cals.

Après 3 mois d'expériences diverses (cf. chap. IV.2.5 et IV.3) consistant entre autres à faire varier la durée d'éclairement et l'intensité lumineuse, nous n'avons pu mettre en évidence de façon sûre une influence de ces facteurs sur le développement des cals. Dans certains cas toutefois, les cals exposés à la lumière 12 heures par jour se sont mieux développés que ceux qui étaient maintenus à l'obscurité. De ce fait, nous avons opté pour un éclairage moyen de 12 heures par jour. Source d'éclairage : tubes fluorescents de marque Osram, qualité Fluora, à haute teneur en lumière rouge. Ces tubes sont destinés spécialement à la culture des végétaux. Intensité lumineuse : ~ 700 lux, au niveau des tissus en culture.

IV.2.5 Développement des explantats primaires

a) Plantules

Au bout de 3 semaines de culture, nous avons observé sur les feuilles et les tigelles de toutes les plantules

des épaississements non structurés, légèrement granuleux et très mous.

Après 5 semaines, 60% des plantules étaient recouvertes d'un cal assez épais. Les autres plantules avaient également développé un cal, mais de moindre importance.

L'éclairage de 12 heures par jour a semblé favorable au développement.

b) Explantats de feuilles

Après 5 semaines de culture, nous avons observé sur tous les explantats la formation de tissus indifférenciés, localisés essentiellement sur les nervures. Les tissus cultivés sur milieu avec kinétine (1 ppm) étaient de consistance assez molle, ceux cultivés sur milieu sans kinétine étaient de consistance extrêmement molle, ressemblant à une gelée.

L'influence de l'éclairage n'a pu être mise en évidence dans ce cas.

c) Explantats de tiges

Sur 30% des explantats (ceux de faible diamètre) des néoformations indifférenciées se sont produites, sous forme de masse cellulaire compacte, ferme mais friable; ces cals se sont développés dans le sens radial, à la surface du milieu :

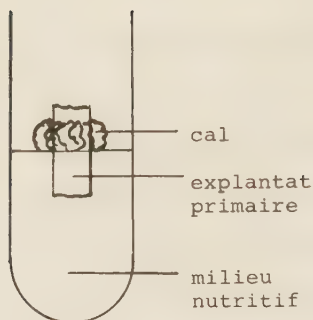


Figure 7

Aspect des explantats de tige
après 3 semaines de culture sur
milieu MS + 1 ppm kinétine

Les autres explantats ont dépéri rapidement.

L'influence de la lumière n'a pas été évidente.

En résumé, on peut dire qu'à ce stade du développement, l'éclairage n'a pas induit de différences sensibles dans l'aspect ou l'évolution des cals. Par contre, les tissus semblent avoir une consistance plus ferme en présence de 1 ppm de kinétine qu'en son absence. Cette constatation est en accord avec celle de *Eríksson*¹⁰¹.

IV.2.6 Repiquages

IV.2.6.1 Premier repiquage

Le premier repiquage consiste en principe à isoler de l'explantat primitif des fragments capables de se développer ultérieurement.

Nous l'avons effectué dès que les cals ont présenté un développement suffisant, soit :

pour les plantules : après 5 semaines de culture

pour les feuilles : après 5 semaines de culture

pour les tiges : après 7 semaines de culture

Les fragments de cals en contact avec les tissus des plantules étaient légèrement nécrosés; cependant, en raison de la petite taille de ces cals, nous avons dû les repiquer intégralement et sans subdivision.

Les cals formés sur les tissus de feuille n'ont pu être séparés de l'explantat primitif, en raison de leur petite taille et de leur répartition sur les nervures. Nous nous sommes donc contentés de les transporter tels quels sur du milieu frais.

Les cals de tiges ont pu être subdivisés en plusieurs fragments. La partie en contact avec l'explantat primitif était brun-noir; nous avons rejeté ces fragments nécrosés.

IV.2.6.2 Repiquage de routine

Le repiquage des cultures de tissus a pour but de prolonger indéfiniment leur activité. Il est rendu nécessaire par un certain nombre de phénomènes, dont voici les principaux^{38,119} :

- l'épuisement et le dessèchement du milieu nutritif
- l'asphyxie des régions internes des colonies
- l'écrasement des régions périphériques contre les parois du récipient
- l'accumulation de métabolites dont certains peuvent intoxiquer la culture.

Les cultures sur agar sont généralement repiquées toutes les 4 à 6 semaines.

Nous avons repiqué nos cals toutes les 5 semaines.

Technique utilisée : Tout le matériel nécessaire au repiquage est placé dans une enceinte de flux d'air laminaire.

Les cals sont prélevés aseptiquement et découpés en petits morceaux dans des boîtes de Pétri stériles. Les parties nécrosées sont rejetées. Les fragments sains sont transférés sur du milieu frais. Ces cals très mous et très friables se désagrègent facilement lors du prélèvement. On repique alors plusieurs petits fragments à la fois.

Des inocula trop petits ne survivent généralement pas au transfert, ou se développent extrêmement lentement. Des inocula trop grands nécessitent des repiquages trop fréquents.

Nous nous sommes efforcé de repiquer des fragments de forme cubique de dimensions constantes (environ 4 mm

de côté). Le poids de ces inocula variait entre 100 et 200 mg.

Problème de sélection : Lors du repiquage des cultures en milieu solide, il est difficile d'éviter une certaine sélection des cals : l'opérateur aura tendance par exemple à ne repiquer que les cals bien développés ou les fragments d'aspect satisfaisant. Ce mode de faire est cependant incompatible avec l'étude objective de l'influence de certains constituants du milieu que nous nous proposons de faire (cf. chap. IV.5). Pour remédier à cette tendance, nous avons utilisé un système désignant selon un hasard total les cals à repiquer. Il est évident que nous n'avons pu suivre ce mode de prélèvement qu'après avoir obtenu des cals en quantité suffisante.

IV.3 Evolution des cals

IV.3.1 Cals formés à partir des tissus de plantules

Nous avons cultivé tous les cals issus de plantules sur milieu MS sans kinétine, la moitié d'entre eux à l'obscurité et l'autre moitié à la lumière (700 lux) 12 h/jour.

Après deux mois et demi de culture (= 2 passages), les cals étaient très peu développés, et ceci indépendamment des conditions d'éclairage. A de rares exceptions près, il ne nous a pas été possible de les subdiviser lors du repiquage. Certains formaient des colonies composées, c'est-à-dire des agrégats de nodules à peu près sphériques, de dimensions régulières et se séparant les uns des autres au moindre contact. D'autres formaient des colonies dissociées (masse informe d'aspect gélatineux dont les cellules sont plus ou moins isolées les unes des autres).

Ces résultats nous ont incité à cultiver par la suite la moitié des cals en présence de kinétine, à la concentration de 1 ppm. Nous avons maintenu la moitié des tissus de chaque série à l'obscurité et exposé l'autre moitié à la lumière, 12 h par jour (700 lux).

Après 5 mois de culture (4 passages), tous les cals cultivés en présence de kinétine étaient bien développés. Ils étaient fermes, formant des colonies charnues (masse com-

pacte de la consistance d'un parenchyme), à peu près sphériques. Les cals cultivés en absence de kinétine continuaient à se développer très faiblement et à former des colonies dissociées.

L'influence de la lumière, quoique peu prononcée, nous a semblé favorable.

IV.3.2 Cals formés à partir des tissus de feuilles

Nous avons cultivé une moitié des cals sur milieu MS contenant de la kinétine, et l'autre moitié sur milieu sans kinétine, en subdivisant chaque lot en 3 sous-groupes, en fonction des conditions d'éclairement :

1. obscurité
2. lumière (700 lux) 12 h/jour
3. lumière (env. 350 lux) 12 h/jour.

Après deux mois et demi de culture (= 2 passages) les cals s'étaient étendus à toute la surface de la feuille, et nous avons pu les séparer des explantats primitifs. Ceux qui avaient été cultivés en présence de kinétine, étaient de consistance relativement molle ; leur développement était moyen, bon ou très bon selon qu'ils avaient été cultivés à l'obscurité, à la lumière moyenne (700 lux), ou à la lumière faible (350 lux). Les cals cultivés en absence de kinétine étaient beaucoup moins développés ; leur consistance était celle d'une gelée.

L'influence de la lumière et celle de la kinétine ont donc été déterminantes pour les tissus de cette souche.

IV.3.3 Cals formés à partir des tissus de tiges

Nous avons cultivé tous les cals issus de la tige sur le milieu MS contenant 1 ppm de kinétine, la moitié d'entre eux à l'obscurité et l'autre moitié à la lumière (700 lux) 12 h/jour.

Après 3 mois de culture (= 2 passages) les cals étaient très bien développés, de consistance ferme, formant des colonies charnues. A ce stade, leur croissance était nettement plus importante que celle des cals issus de plantules ou de feuilles.

Après environ 4 mois et demi de culture (= 3 passages), tous les tissus étaient très bien développés, sans différence entre les cultures exposées à la lumière et celles qui étaient maintenues dans l'obscurité. Tous les cals étaient fermes, mais nécrosés (coloration brun foncé) autour des zones de contact avec le milieu et l'inoculat.

Il est apparu, à ce stade, que la présence de kinétine (1 ppm) stimule la croissance des cals et rend ceux-ci plus fermes et moins friables. Nous ne pouvons affirmer cependant que la concentration de cytokinine utilisée était optimum.

Nous ne saurions nous prononcer sur l'effet de la lumière, bien qu'elle ait semblé favorable dans quelques cas.

A la suite de ces premiers essais, nous avons opté définitivement pour un éclairage de 12 h par jour (700 lux).

Cette partie de notre travail avait pour but la mise au point de cultures de cals. Les premières observations de l'aspect des tissus et de leur développement, nous ont guidé dans le choix des conditions de culture que nous avons adoptées pour la suite de nos recherches.

Les repiquages qui ont suivi, nous ont permis d'isoler des clones, puis d'entreprendre une étude plus systématique et plus approfondie de l'influence de certains facteurs sur l'évolution des cultures.

IV.4 Sélection de clones ou souches

Le terme de clone est utilisé dans deux sens différents et peut prêter à confusion : il peut désigner une souche provenant d'un seul explantat primaire^{38,99}, composé évidemment de nombreuses cellules. Les cals qui en résulteront ne seront pas forcément homogènes ; des régions qui diffèrent par leur texture, leur couleur ou leur rythme de croissance peuvent apparaître. Des repiquages sélectifs de ces zones peuvent aboutir à la sélection de plusieurs "variants cloniques"³⁸ (= "clonal variants"). Le terme de clone peut également désigner des cultures dérivant d'une seule cellule ; dans ce cas, on parle aussi de clone unicellulaire¹²⁶. Des différences importantes apparaissent entre des clones unicellulaires dérivant d'un même tissu¹²⁶.

Dans notre travail, nous avons isolé 3 clones correspondant à la première des définitions exposées ci-dessus, et que nous appellerons dorénavant "souches", pour éviter toute confusion. L'origine des explantats primitifs ayant servi à l'établissement de ces souches figure au chapitre IV.2.

La souche D.P.1 dérive d'un seul fragment du cal formé sur la tigelle d'une plantule. Elle a été établie sur le milieu MS contenant 1 ppm de 2,4-D. Après 2 mois et demi de culture, le milieu avait été complété par l'adjonction de kinétine à la concentration de 1 ppm.

La souche D.P.2 dérive d'un seul fragment du cal formé sur un explantat primitif de feuille. Elle a été établie sur le milieu MS contenant 1 ppm de 2,4-D et 1 ppm de kinétine.

La souche D.P.3 dérive d'un seul fragment du cal formé sur un explantat primitif de tige. Elle a été établie sur le milieu MS contenant 1 ppm de 2,4-D et 1 ppm de kinétine.

Toutes les souches ont été établies dans les conditions suivantes : éclairage de 700 lux pendant 12 h par jour et température de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

IV.5 Etude de quelques facteurs susceptibles de modifier l'aspect, la croissance et le métabolisme des cals de Digitale pourpre.

IV.5.1 But de l'expérience

Le but de notre travail était, rappelons-le, d'établir d'abord une culture de tissus indifférenciés de Digitale pourpre se développant le mieux possible, puis d'étudier qualitativement et quantitativement les dérivés du stérane élaborés par ces tissus.

A notre connaissance, l'étude de la production de stéroïdes en fonction de la composition du milieu nutritif, n'a pas fait l'objet d'un grand nombre de travaux jusqu'à présent. Les études de milieux de culture sont pour la plupart consacrées à l'élaboration de formules qui assurent une croissance maximum des tissus.

Nous avons déjà vu au chapitre IV.1 le rôle important que joue la composition des milieux nutritifs dans la croissance et la structure des tissus. Les autres facteurs écologiques usuels (éclairage^{39,127}, température, et aussi aération et agitation⁶⁰ pour les cultures en milieu liquide) sont tout aussi déterminants à cet égard, et susceptibles d'influencer la biosynthèse des métabolites secondaires. Celle-ci est également influencée par les facteurs de croissance. Il n'est

cependant pas toujours facile de déterminer si les effets observés résultent d'une action directe ou s'ils sont dûs à l'action de ces facteurs sur la croissance et la morphologie de la culture¹²⁷.

Nous résumons ci-dessous l'essentiel de deux travaux ayant trait à la biosynthèse de métabolites secondaires sous l'influence d'auxines et de cytokinines.

Kaul et Staba⁵⁷ ont analysé les tissus de *Dioscorea deltoidea* (cals et suspension de cellules) formés en présence et en absence de 2,4-D. En présence de cette auxine, les tissus se sont mieux développés et ont produit des quantités appréciables de diosgénine (1 %). En absence de 2,4-D, les tissus se sont différenciés petit à petit (formation de racines) et la production de diosgénine a beaucoup diminué. Par la suite, ces chercheurs¹⁰⁸ ont trouvé que la production de diosgénine atteint un maximum (229 mg/100 g de tissu séché) pour une concentration de 0,1 ppm de 2,4-D, qu'elle tombe à 158 mg/100 g en absence de 2,4-D et qu'elle n'atteint que 77 mg/100 g en présence de 5 ppm de 2,4-D.

Les résultats de Sargent et Skoog¹¹² nous ont également paru intéressants. Ces auteurs ont constaté que la production de scopoline par les cultures de tissus de Tabac est une fonction de la concentration de kinétine ajoutée au milieu. L'adjonction d'auxine (IAA) en faible quantité leur a semblé nécessaire pour contraindre les tissus à produire de très grandes quantités de scopoline.

Compte tenu de ces travaux d'une part, de l'évolution de nos cultures et de l'absence d'hétérosides cardiotoxiques dans les premiers tissus récoltés d'autre part, nous avons décidé d'approfondir le problème de production de métabolites secondaires par les tissus de *Digitalis purpurea*.

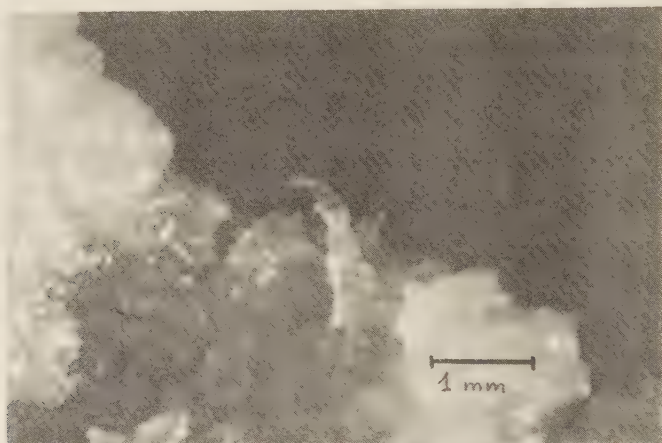
Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons dû limiter notre travail à l'étude de 3 paramètres :

- origine de la souche : nous avons étudié 3 souches différentes en parallèle
- milieu de culture : toutes les cultures ont été effectuées sur 2 milieux différents
- absence ou présence de cytokinine dans le milieu de culture : une partie des cultures a été effectuée dans les milieux ci-dessus en absence de cytokinine. Le travail de *Sargent et Skoog*¹¹² nous a incité à effectuer également des cultures en présence de kinétine à 3 concentrations différentes.

Toutes ces cultures ont été faites en présence d'une auxine, le 2,4-D, à la concentration de 1 ppm, malgré les inconvénients qui résultent de l'emploi de cette substance (cf. chap. IV.1.2). En effet, des essais de culture avec l'IAA ont provoqué une forte baisse de la croissance, confirmant ainsi les expériences de *Pilgrim*¹⁰⁷. D'autre part, un abaissement de la concentration de 2,4-D à 0,5 ppm a rapidement stimulé la formation de tissus organisés. (Fig. 8).

Figure 8

Cal de Digitalis purpurea avec début d'organogenèse



Le 2,4-D a été utilisé à notre connaissance dans presque toutes les cultures *in vitro* de *Digitalis purpurea* (cf. Ch. I), à la concentration de 0,1 ou 1 ppm. Des travaux sur d'autres espèces végétales ont prouvé que sa présence n'est pas incompatible avec la biosynthèse de stéroïdes^{55,56,119}.

IV.5.2 Conditions de travail

a) Choix des milieux nutritifs : le milieu de Murashige et Skoog⁹¹ a été utilisé avec succès pour la production de métabolites secondaires de nature stéroïdique (sapogénines^{56,59,108} et stérols^{55,56}). Nous avons donc décidé de poursuivre une moitié de nos cultures sur le milieu MS.

Tableau 3

Comparaison des milieux MS et SH

I. Constituants minéraux

Milieu	MS	SH
	ions-g / 1000 l	
NH_4^+	21	2,6
NO_3^-	40	25
PO_4^{---}	1,25	2,6
K^+	20,3	25
Ca^{++}	2,9	1,36
Mg^{++}	1,5	1,6
Na^+	0,002	0,0004
SO_4^{--}	1,63	1,66
BO_3H_2^-	0,1	0,08
I^-	0,005	0,005
Mn^{++}	0,1	0,06
Zn^{++}	0,03	0,0035
Cu^{++}	0,0001	0,0008
MoO_4^{--}	0,001	0,0004
Co^{++}	0,0001	0,0004
Fe^{++}	0,1	0,054

II. Constituants organiques

Milieu	MS	SH
Constituants	mg / l	
glycocolle	2	
acide nicotinique	2	5
biotine	1	
choline, HCl	1	
pantothénate de calcium	1	
pyridoxine, HCl	1	0,5
thiamine, HCl	1	5
acide p-aminobenzoïque	0,5	
riboflavine	0,5	
acide folique	0,5	
myoinositol	5000	1000
saccharose	20000	30000

Après différents essais, nous avons choisi comme deuxième milieu de culture celui de *Schenk et Hildebrandt*⁹⁵ (SH). Ce milieu a été mis au point pour la culture de monocotylédones et de dicotylédones. Il se distingue principalement du milieu MS (voir tableau 3) par une teneur plus faible en azote inorganique, en calcium et en myoinositol, par une teneur plus élevée en phosphates, thiamine, acide nicotinique et saccharose, et par sa simplicité : en effet, il ne contient aucun acide aminé et la plupart des vitamines du milieu MS n'y figurent pas. La composition des 2 milieux figure au chapitre IV.1.3.

b) Concentrations de kinétine : 0, 0,25, 0,50 et 1,00 ppm.*

c) Souches utilisées : les 3 souches précédemment décrites D.P.1, D.P.2 et D.P.3 (cf. Ch. IV.4).

d) Conditions de culture : cf. Ch. IV.2.4.

e) Nombre de cals : au début de ce travail, 17 à 18 tubes par milieu, pour chaque concentration de kinétine étudiée et pour chaque souche ; au bout de 6 mois : 12 tubes, ce qui constitue un minimum pour pouvoir entreprendre l'analyse des reliquats des cals après les repiquages.

f) Durée des passages : au début de l'expérience : 6 semaines ; après 3 passages : 5 semaines.

g) Durée totale de l'expérience : du 5.12.1974 au 3.11.1975, soit 9 passages.

*(Pour des raisons de simplicité, ces concentrations seront abrégées par la suite en : 0, 0,25, 0,5 et 1).

Passé ce délai, les cultures ont été maintenues sur milieu SH seulement.

IV.5.3 Influence des facteurs étudiés sur l'aspect des cals

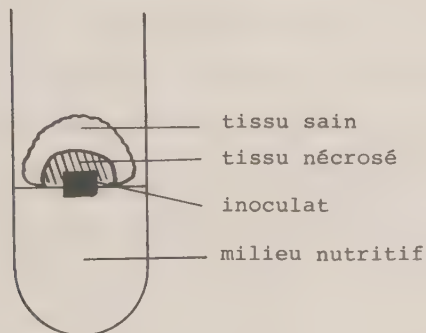
Après un passage : milieu MS : cals petits, couleur gris-vertâtre, consistance molle ; nécrose de l'inoculat et des zones qui l'entourent ; pas d'influence visible de la kinétine.

milieu SH : cals moyens, couleur blanc-vert, colonies charnues, fermes ; peu de nécrose, limitée à la zone de contact avec le milieu ; pas d'influence visible de la kinétine.

Après 4 passages : milieu MS : les zones inférieures de tous les cals présentent des nécroses (fig. 9) ; souche D.P.1, cals fermes, colonies composées ; souches D.P.2 et D.P.3, cals mous, colonies composées ; la souche D.P.2 se développe le moins.

Figure 9

Cal partiellement nécrosé



milieu SH : cals très bien développés ; très peu nécrosés au niveau des zones inférieures. La majorité des cals est colorée en rouge plus ou moins foncé. La coloration semble se produire au sommet du cal et s'étendre vers le bas.

D'une façon générale, les cals cultivés sur milieu SH sont nettement plus gros que ceux cultivés sur milieu MS ; ceux cultivés sur les milieux contenant 0,25 ppm de kinétine, sont les plus développés de chaque série.

Après 5 passages : *milieu MS* : les zones inférieures sont invariablement nécrosées.

milieu SH : coloration rouge plus importante qu'après 4 passages ; nombreux cals complètement nécrosés dans leur partie supérieure : la coloration, de plus en plus intense, diffuse jusque dans le milieu nutritif ; si les cals ne sont pas repiqués à ce moment, les zones supérieures se dessèchent totalement et meurent. Les cals les plus affectés semblent être ceux dont la croissance est la plus forte. Les nombreux essais effectués pour trouver la cause de cette nécrose n'ont pas permis d'élucider totalement ce problème. La composition du milieu et la kinétine en sont peut-être indirectement responsables en raison du fort développement qu'elles induisent. Nous avons émis l'hypothèse que cette nécrose est due à l'accumulation de métabolites qui intoxiquent petit à petit les tissus. Nous pensons qu'il pourrait s'agir d'antraquinones (p. ex. digitolutéine et hydroxy-4-digitolutéine) dont la présence dans les cultures de

tissus de *Digitalis lanata* a déjà été signalée⁶³.

N'ayant pas trouvé de remède à cette nécrose, nous nous sommes contentés d'éliminer, lors des repiquages, les tissus les plus atteints et de diminuer à 5 semaines la durée des passages.

Après 8 passages : *milieu MS* : souche D.P.1 : cals bien développés et peu nécrosés (zone inférieure) ; souches D.P.2 et D.P.3 : cals plus petits et présentant des nécroses plus importantes que la souche D.P.1 ; fait exception la souche D.P.2 à 0,25 ppm de kinétine, dont les cals donnent tous des signes de synthèse chlorophyllienne, sont très bien développés et présentent peu de nécroses. Indépendamment de la souche, les cals cultivés sur MS/0,25 semblent être les plus volumineux.

milieu SH : cals bien développés ; nécroses des zones supérieures en nette régression. L'influence de la kinétine n'est pas visible.

L'ensemble de nos observations peut être résumé ainsi :

- le milieu SH semble stimuler plus fortement la croissance des cals que le milieu MS ;
- les différentes concentrations de kinétine ne provoquent pas de modifications visibles à l'oeil nu ;

- la souche D.P.1 est plus vigoureuse que les 2 autres souches ;
- les cals forment tous des colonies composées, dont la consistance est ferme pour la souche D.P.1 et molle pour les deux autres souches.
- seuls les cals de la souche D.P.2, cultivés sur milieu SH/0,25 présentent des signes visibles de synthèse chlorophyllienne ;
- toutes les cultures sans exception sont restées à l'état indifférencié. (Fig. 10).

Figure 10

Cal de Digitalis purpurea après 5 semaines de culture.

Stéréomicroscope IV, Carl Zeiss



IV.5.4 Détermination de l'indice de croissance

IV.5.4.1 Définition et méthode de calcul

L'indice de croissance (IC) est le rapport du poids frais final d'un cal au poids frais initial. La détermination du poids frais initial se fait par pesée des tubes de culture avant et après inoculation. La mesure du poids frais final se fait après avoir retiré les cals des tubes de culture.

IV.5.4.2 Résultats

Nous avons fait une première détermination des IC lors du 9ème passage des tissus cultivés dans les conditions décrites sous *IV.5.2* (période du 27.9 au 3.11.1975), (tableau 4).

Pour savoir si ces IC se modifient au cours du temps et si la culture se stabilise, nous avons effectué une deuxième série de mesures 20 mois plus tard (période du 7.6 au 13.7.1977), (tableau 5).

Tableau 4

Calcul des IC Période du 27.9 au 3.11.1975

$$IC = \text{Indice de croissance} = \frac{\text{Poids frais final (en g)}}{\text{Poids frais initial (en g)}}$$

PI = Poids initial (Valeur moyenne de 5 ou 6 calcs)

PF = Poids final (Valeur moyenne de 5 ou 6 calcs).

Souche	D.P.1			D.P.2			D.P.3		
	PI	PF	IC	PI	PF	IC	PI	PF	IC
MS/0	0,339	2,677	7,90	0,211	2,025	9,60	0,398	3,891	9,78
MS/0,25	0,433	5,396	12,5	0,310	3,846	12,4	0,375	4,796	12,8
MS/0,5	0,489	5,608	11,5	0,255	2,465	9,67	0,413	4,496	10,9
MS/1	0,386	3,868	10,0	0,393	3,093	7,87	0,391	3,886	9,94
SH/0	0,388	9,156	23,6	0,397	5,011	12,6	0,396	4,397	11,1
SH/0,25	0,424	9,361	22,1	0,387	5,676	14,7	0,403	6,135	15,2
SH/0,5	0,497	10,251	20,6	0,478	5,271	11,0	0,363	7,392	20,4
SH/1	0,392	6,226	15,9	0,444	6,951	15,7	0,398	6,446	16,2

Tableau 5

Calcul des IC Période du 7.6 au 13.7.1977

$$IC = \text{Indice de croissance} = \frac{\text{Poids frais final (en g)}}{\text{Poids frais initial (en g)}}$$

PI = Poids initial (valeur moyenne de 10 à 12 calcs)

PF = Poids final (valeur moyenne de 10 à 12 calcs).

Souche	D.P.1			D.P.2			D.P.3		
	PI	PF	IC	PI	PF	IC	PI	PF	IC
SH/0	0,354	11,850	33,5	0,302	5,875	19,5	0,247	1,825	7,39
SH/0,25	0,335	6,525	19,5	0,296	3,263	11,0	0,293	6,943	26,7
SH/0,5	0,395	8,892	22,5	0,300	8,050	26,8	0,255	3,979	15,6
SH/1	0,416	8,493	20,4	0,302	7,819	25,8	0,237	4,714	19,9

(Cette série ne comprend évidemment que des calcs cultivés sur le milieu SH,
l'autre milieu ayant été abandonné).

Les 2 séries de valeurs obtenues pour le milieu SH ont été soumises ensuite à un test de t (Student), (tableau 6).

Tableau 6

Influence de l'âge de la culture sur l'indice de croissance

Souche		D.P.1	D.P.2	D.P.3
Milieu	SH/0	+ (A)	+ (A)	+ (B)
	SH/0,25	0	+ (B)	+ (A)
	SH/0,5	0	+ (A)	+ (B)
	SH/1	+ (A)	+ (A)	0

0 : pas de différence significative ($P = 0,05$)

+ : différence significative ($P = 0,05$)

(A : augmentation de l'IC avec l'âge de la culture,

B : baisse de l'IC avec l'âge de la culture).

IV.5.4.3 Discussion des résultats

Période du 27.9 au 3.11.1975 (tableau 4)

a) milieu MS : on remarquera que tous les IC sont situés entre 7,9 et 12,8, ce qui indique que les variations sont relativement faibles. On constate cependant que les IC maximum

correspondent à la concentration de 0,25 ppm de kinétine, pour les 3 souches étudiées, et que les IC minimum correspondent aux concentrations de 0 et 1 ppm de kinétine. Il n'y a pas de différence importante entre les 3 souches : les IC varient de 7,9 à 12,5 pour D.P.1 ; de 7,9 à 12,4 pour D.P.2 et de 9,8 à 12,8 pour D.P.3. La valeur de l'indice de croissance maximum est donc pratiquement la même pour les 3 souches.

b) milieu SH : les valeurs sont beaucoup plus dispersées que pour le milieu MS (de 11,0 à 23,6). Nous ne pouvons pas discerner l'influence de la kinétine. La comparaison des différentes souches montre que c'est pour la D.P.1 que les IC sont les plus élevés (15,9 à 23,6) et pour la D.P.2 qu'ils sont les plus bas (11,0 à 15,7), mais les moins dispersés.

La comparaison des 2 milieux montre que pour chaque souche, à concentration de kinétine égale, l'IC est plus élevé pour le milieu SH.

Période du 7.6 au 13.7.1977 (tableau 5)

Les IC sont extrêmement dispersés (de 7,4 à 33,5) et nous ne pouvons distinguer ni l'influence de la souche, ni celle de la concentration de kinétine.

Tableau 7

Tableau comparatif des IC obtenus avec le milieu SH

Souche		D.P.1		D.P.2		D.P.3	
Période		27.9 - 3.11.75	7.6 - 13.7.77	27.9 - 3.11.75	7.6 - 13.7.77	27.9 - 3.11.75	7.6 - 13.7.77
Milieu	SH/0	23,6	33,5	12,6	19,5	11,1	7,4
	SH/0,25	22,1	19,5	14,7	11,0	15,2	26,7
	SH/0,5	20,6	22,5	11,0	36,8	20,4	15,6
	SH/1	15,9	20,4	15,7	25,8	16,2	19,9

La comparaison avec la première série de valeurs sur milieu SH est difficile à interpréter (voir tableau comparatif 7). Le test de t prouve qu'il y a des différences significatives entre la plupart des IC des deux séries (voir tableau 6), mais nous ne pouvons en dégager une tendance générale.

En conclusion, la détermination des IC nous a permis de mettre en évidence l'effet positif de la kinétine à la concentration de 0,25 ppm, dans le milieu MS. En revanche, dans le milieu SH, la présence de kinétine ne semble pas être un élément stimulant.

L'influence la plus évidente sur la croissance des cals est celle du milieu de culture. La croissance relativement forte des tissus sur le milieu SH est peut-être due à la grande quantité de thiamine que contient ce milieu.

IV.5.5 Analyse par covariance de la croissance des tissus

IV.5.5.1 Description de la méthode

Les observations à l'oeil nu (cf.Ch. IV.5.3) et les calculs des IC (cf.Ch.IV.5.4), ne nous ont pas permis de mettre en évidence une influence incontestable de tous les paramètres étudiés. Il existe cependant une autre quantité variable que l'on peut mesurer, mais dont on ne peut pas choisir d'emblée la valeur : c'est le poids initial des cals. Or, nous avons constaté que ce poids joue un rôle sur la croissance des cals, ce dont nous n'avions pas tenu compte auparavant. Cette observation nous a amené à effectuer une nouvelle analyse statistique en utilisant la méthode de la covariance, dans l'espoir de détecter de manière objective des différences significatives.

L'utilisation de la covariance permet de tenir compte de certains facteurs de variation qu'il est difficile ou même impossible de maintenir constants au cours de l'expérimentation, mais que l'on peut mesurer à chaque essai. Elle permet d'estimer les réponses que l'on aurait obtenues si ce facteur accessoire avait été maintenu constant.

Dans une étude comme la nôtre, il n'est pas possible de repiquer des inoculats ayant exactement le même poids, mais on peut déterminer le poids de chaque inoculat. La méthode d'analyse par covariance permet alors de corriger chaque réponse.

Pour déterminer l'influence de chaque variable, (nature du milieu, concentration de la kinétine, origine de la souche) sur la croissance, nous avons d'abord calculé l'augmentation de poids de chaque cal par la formule $y = C_1 - C_0$ (C_0 étant le poids du cal au moment du repiquage et C_1 son poids au moment de la récolte). Puis nous avons soumis ces valeurs à une analyse de covariance. Nous avons obtenu de cette façon des valeurs corrigées. Enfin, nous avons effectué sur ces valeurs une analyse de variance.

Pour le calcul, nous avons fait appel à un programme de bibliothèque¹²⁸ disponible sur l'ordinateur CDC 3800 de l'Université de Genève.

IV.5.5.2 Résultats

Les analyses ont été effectuées sur les valeurs obtenues pour la période du 27 septembre au 3 novembre 1975 (comme pour la détermination des IC).

Les résultats figurent dans les tableaux 8 à 10.

IV.5.5.3 Discussion des résultats

Nous allons d'abord étudier l'influence de chaque variable prise séparément :

- Milieu nutritif : il est incontestable que le milieu SH stimule plus fortement la croissance que le milieu MS (voir tableau 8). Ceci confirme les observations faites jusqu'ici. Ce fait peut être dû à la forte teneur de ce milieu en saccharose, en acide nicotinique et surtout en thiamine.

Tableau 8

*Etude de l'influence du milieu sur la
croissance des cals
(analyse de covariance)*

MILIEUX	SOUCHES		
	D.P.1	D.P.2	D.P.3
MS/0 SH/0	0	+ SH	+ SH
MS/0,25 SH/0,25	0	+ SH	+ SH
MS/0,5 SH/0,5	+ SH	+ SH	+ SH
MS/1 SH/1	+ SH	0	+ SH

0 : pas de différence significative ($P = 0,05$)

+ : différence significative ($P = 0,05$)

Le sigle à côté du signe +, indique le milieu dans lequel la croissance est la plus forte.

Tableau 9

Etude de l'influence de la concentration de kinétine
sur la croissance des cals (analyse de covariance)

Souche D.P.1

Conc. kinétine ppm	0		0,25		0,5	
Milieu	MS	SH	MS	SH	MS	SH
0,25	+ G	0				
0,5	+ G	0	0	0		
1,0	+ G	+ H	+ H	+ H	+ H	+ H

Souche D.P.2

Conc. kinétine ppm	0		0,25		0,5	
Milieu	MS	SH	MS	SH	MS	SH
0,25	+ G	0				
0,5	0	0	+ H	0		
1,0	0	+ G	+ H	+ G	0	+ G

Souche D.P.3

Conc. kinétine ppm	0		0,25		0,5	
Milieu	MS	SH	MS	SH	MS	SH
0,25	+ G	0				
0,5	0	+ G	0	+ G		
1,0	0	+ G	+ H	0	0	+ H

0 : pas de différence significative (P = 0,05)

+ : différence significative (P = 0,05)

(H : croissance plus forte pour la concentration de kinétine indiquée en haut du tableau).

(G : croissance plus forte pour la concentration de kinétine indiquée à gauche du tableau).

Tableau 10

*Etude de l'influence de l'origine de la souche sur la
croissance des cals (analyse de covariance)*

SOUCHES	MILIEUX			
	MS/0	MS/0,25	MS/0,5	MS/1
D.P.1 D.P.2	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
D.P.1 D.P.3	+ 3	0	+ 1	0
D.P.2 D.P.3	0	0	+ 3	+ 3

SOUCHES	MILIEUX			
	SH/0	SH/0,25	SH/0,5	SH/1
D.P.1 D.P.2	+ 1	+ 1	+ 1	0
D.P.1 D.P.3	+ 1	+ 1	+ 1	0
D.P.2 D.P.3	0	0	+ 3	0

0 : pas de différence significative (P = 0,05)

+ : différence significative (P = 0,05)

Le numéro à côté du signe + indique la souche
qui se développe le mieux.

- Kinéline : bien que la croissance ne soit pas significativement différente dans tous les cas, on peut dire que les cals cultivés sur milieu MS se développent le mieux en présence de 0,25 ppm de kinéline et que l'absence de kinéline est la solution la moins favorable (voir tableau 9).

Sur milieu SH, la réponse aux différentes concentrations de kinéline varie avec chaque souche :

D.P.1 : la croissance est la plus faible en présence de 1 ppm de kinéline; il n'y a pas de différences significatives entre les 3 autres valeurs.

D.P.2 : la croissance est la plus forte en présence de 1 ppm de kinéline; il n'y a pas de différences significatives entre les 3 autres valeurs.

D.P.3 : la croissance est la plus forte en présence de 0,5 ppm de kinéline.

- Souche : il est incontestable que la souche qui se développe le mieux est la D.P.1. Des différences significatives entre les souches D.P.2 et D.P.3 n'apparaissent que dans 3 cas; elles montrent alors que c'est la souche D.P.3 qui se développe le mieux (voir Tableau 10).

En conclusion, on peut dire que la culture qui se développe le mieux est celle provenant de la souche D.P.1, sur milieu SH, en absence de kinéline ou en présence de 0,25 ou 0,5 ppm de cette substance.

La présence de kinétine est favorable dans le milieu MS. Dans le milieu SH et sur la souche D.P.1, elle n'a aucun effet aux concentrations inférieures (0, 0,25 et 0,5 ppm), mais elle semble inhiber la croissance à la concentration de 1 ppm. Sur les souches D.P.2 et D.P.3, elle a un effet stimulant aux concentrations relativement élevées, 1 ppm pour la première et 0,5 ppm pour la seconde.

La présence de kinétine ne semble donc être un élément favorable que dans les cas où la croissance est relativement faible. Les facteurs les plus importants qui conditionnent un bon développement, sont la composition du milieu nutritif et l'origine de la souche.

IV.5.6 Relation entre poids frais et poids sec

IV.5.6.1 Méthode

Tous les cals sont pesés immédiatement après la récolte, puis après séchage jusqu'à poids constant (24 h à 50⁰, dans une étuve à circulation d'air).

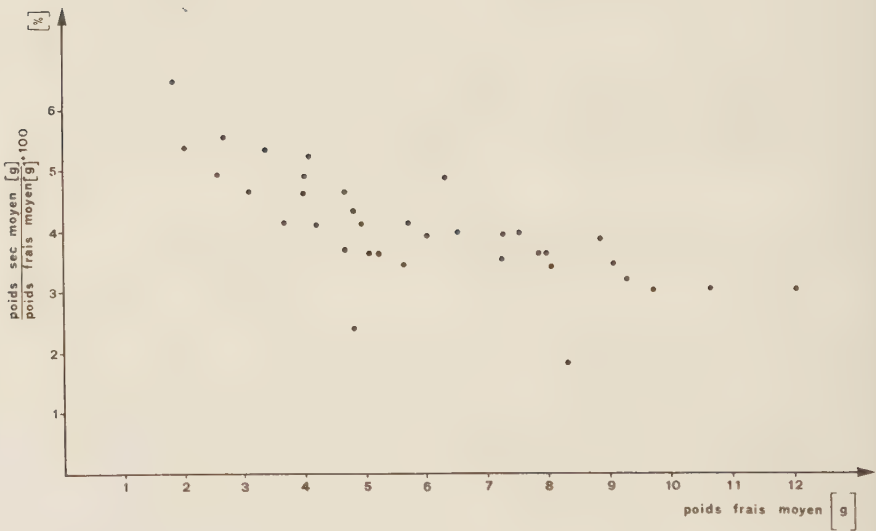
On calcule pour chaque série, les valeurs moyennes des poids frais finals (Pf) et celles des poids secs finals (Ps), puis on établit le rapport $100.Ps/Pf$.

IV.5.6.2 Résultats

Les valeurs ont été calculées pour les périodes du 27 septembre au 3 novembre 1975 et du 7 juin au 13 juillet 1977. Les résultats sont représentés dans la figure 11.

Figure 11

Relation entre le poids frais (Pf) des
cals et le rapport $\frac{Ps}{Pf} \cdot 100$



Il ressort du graphique que plus le poids final du cal est grand, plus le rapport du poids sec au poids frais est faible. Ceci veut dire que plus les cals sont volumineux, plus leur teneur en eau est élevée. Nous n'avons pas déterminé la forme de la courbe qui représente cette variation.

V. Réalisation des cultures en milieu liquide

V.1 Généralités

Une culture en suspension est constituée de cellules ou d'agrégats de cellules dispersés et se multipliant dans un milieu liquide agité. Pendant une période limitée d'incubation, le nombre de cellules augmente; puis la culture atteint son niveau de développement maximum. Si elle est repiquée à ce moment (par dilution dans du milieu frais), elle subira à nouveau un développement analogue jusqu'à un niveau maximum³⁸.

L'agitation du liquide sert à répartir de façon régulière les cellules et agrégats de cellules dans le milieu et à favoriser les échanges gazeux entre le milieu liquide et l'atmosphère³⁸. Elle conditionne donc la croissance des tissus.

La dissociation d'une culture en cellules uniques ou en agrégats de cellules, de même que la dimension de ces agrégats, dépend principalement de la composition des milieux⁹⁶, mais aussi de l'agitation mécanique et des caractéristiques du tissu en question⁶¹.

V.2 But de l'expérience

Les résultats négatifs de la recherche des cardénolides dans les cultures sur milieu solide ne signifient pas forcément que ces composés sont totalement absents dans les tissus indifférenciés. En effet, pour mettre en évidence des

traces d'hétérosides cardiotoniques on doit pouvoir disposer de quantités de tissus beaucoup plus grandes que celles que nous avons obtenues dans la première partie de ce travail.

D'autre part, tout en admettant que la biosynthèse des cardénolides n'est pas liée à la présence d'organes sécréteurs spéciaux, il nous a néanmoins paru intéressant de vérifier si la formation de tissus organisés était une condition *sine qua non* pour que cette biosynthèse ait lieu.

Nous nous sommes donc proposé :

1. de produire une grande quantité de tissus indifférenciés
2. de stimuler une régénération d'organes ou de parties de plantes et
3. de rechercher à nouveau les cardénolides dans les 2 sortes de tissus ainsi obtenus, et de voir si la présence de certains métabolites dans les tissus est en relation avec l'existence de structures différenciées.

Les cultures en milieu liquide nous ont paru comme étant le moyen le plus approprié pour atteindre ce but. En effet, un des nombreux avantages que celles-ci présentent vis-à-vis des cultures sur milieu solide, est la rapidité de multiplication des cellules¹²⁹. De plus, avec ce mode de culture et suivant les conditions choisies, on peut réduire pratiquement à zéro une éventuelle organisation, même rudimentaire, des tissus.

V.3 Etablissement de la culture

V.3.1 Récipients et appareillage

Il existe principalement 2 types de cultures en suspension :

1) les cultures en continu à plus ou moins large échelle, dont les méthodes et appareillages rappellent de près ou de loin ceux utilisés pour la production industrielle de micro-organismes¹³⁰. Les appareils sont soit les fermentateurs⁶⁰ destinés principalement à la culture des microorganismes, soit des appareils plus ou moins complexes, spécialement conçus pour la culture en continu des tissus végétaux (chemostats ou turbidostats¹³¹). Des dispositifs spéciaux assurent des prélèvements intermittents de tissus et un apport de milieu frais, ce qui permet aux cellules de se diviser selon un rythme constant³⁸. L'utilisation de cette méthode est relativement récente; elle nécessite de longues mises au point et le prix élevé des appareils reste un inconvénient majeur.

2) Les cultures en ballons nécessitant des repiquages réguliers. La méthode la plus simple et la moins coûteuse est l'utilisation de fioles coniques (de 250 ml à plusieurs litres), que l'on place sur un agitateur mécanique rotatif.

Nombreux sont les chercheurs qui ont utilisé et utilisent encore cette méthode^{57,104,121}. Mais il existe aussi toute une variété de récipients destinés spécialement à ce

genre de culture^{38,93,107} et qui assurent une meilleure aération du milieu, de même que divers systèmes pour l'agitation des récipients de toutes formes et dimensions^{38,130}.

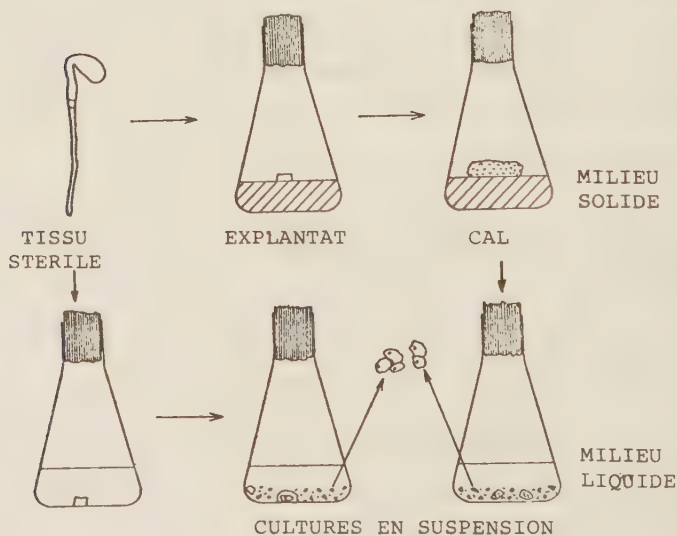
Pour notre travail, nous avons utilisé des fioles coniques de 300 ml, contenant environ 70 ml de milieu liquide et bouchées avec du coton compressé. Ces fioles ont été placées dans un incubateur à agitation "orbitale"^{a)}, équipé d'un dispositif réglant la vitesse de rotation (de 40 à 400 tours/min).

V.3.2 Méthode

Il existe deux méthodes pour établir une culture en suspension (figure 12).

Figure 12

*Procédé pour l'établissement de cultures en suspension
(selon Gamborg et Wetter¹¹⁵)*



^{a)} Gallenkamp, modèle IH-490

La première méthode consiste à placer directement un explantat primaire dans le milieu liquide; la deuxième nécessite d'abord la formation d'un cal dont un fragment est ensuite transféré dans le milieu liquide. La première méthode⁹³ est peu employée. La deuxième est la méthode usuelle^{57,96,99,130}. Elle a fait l'objet d'études particulières, visant, entre autre, à produire des cals friables^{95,99} qui sont particulièrement indiqués pour l'établissement de cultures en suspension.

Etant donné que nous disposions déjà de cultures de cals, qui présentaient l'avantage d'être friables, nous avons choisi cette deuxième méthode. Les cals ont été grossièrement morcelés avant d'être transférés dans les nouveaux milieux.

Nous avons choisi la souche D.P.1 en raison de sa vigueur.

V.3.3 Milieu utilisé

Nous avons choisi le milieu SH⁹⁵, dépourvu d'agar et contenant :

kinétine : 0,02 ppm
2,4-D : 4 ppm au début
0,3 ppm après 2 passages

La composition détaillée de ce milieu figure au chapitre IV.1.3.

Ce milieu n'est pas particulièrement destiné à la culture en suspension. Les premiers essais nous ont cependant donné satisfaction, et nous avons renoncé à essayer d'autres milieux.

Pour favoriser la dissociation des tissus, nous avons utilisé au début de l'expérience une très forte concentration de 2,4-D (4 ppm) dont l'effet principal a été de ralentir énormément la multiplication des cellules.

C'est pourquoi nous avons rapidement réduit sa concentration à 0,3 ppm.

V.3.4 Conditions de culture

Température : $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Un dérèglement accidentel du thermostat nous a apporté la preuve que nos cultures ne supportent pas une température beaucoup plus élevée (48 h à 30° : mort de toutes les cellules).

Eclairage : 12 h/jour

tubes fluorescents, type lumière du jour

intensité : 4400 lux.

Agitation : circulaire 80 tours/min. Différents travaux ont prouvé l'influence de la vitesse de rotation sur la croissance

des tissus^{60,96,126}. Il est évident qu'une vitesse élevée garantit une très bonne aération de la culture, mais l'on doit tenir compte de la friabilité des cellules. De plus, avec une agitation très rapide, les cellules ont tendance à se déposer sur le haut des parois des fioles.

Nous avons observé que les tissus de Digitale pourpre ne se développent plus en dessus de 90 tours/min et qu'en dessous de 80 tours/min ils ont tendance à former de gros agrégats.

V.3.5 Repiquage

Intervalle entre les repiquages : au début de l'expérience, 6 semaines (2 fois), puis 4 semaines.

Méthode : Comme pour le repiquage des cals, le travail est évidemment effectué dans des conditions d'asepsie totale.

Le repiquage consiste à transférer une fraction des tissus dans du milieu frais. Suivant le but recherché, on peut lors du repiquage, et à l'aide d'ustensiles appropriés, sélectionner des agrégats de dimensions définies ou uniquement des cellules isolées.

Dans notre travail, nous n'avons pas cherché à sélectionner des agrégats d'une grandeur particulière, mais seulement à assurer une croissance rapide. Les tissus à repiquer ont été prélevés et transférés dans le milieu frais à l'aide d'une petite passoire métallique montée sur un long manche.

Le problème de la sélection involontaire ne se pose pas dans le cas des cultures en suspension.

Grandeur des inoculats : pour garantir le développement des tissus repiqués, la quantité de l'inoculat doit être choisie en fonction du volume du milieu nutritif⁶¹.

Wang et Staba¹³⁰ ont montré que plus la concentration d'inoculum (soigneusement lavé) dans le nouveau milieu est faible, plus la phase de latence est longue. Selon Reinhard⁶¹, les cellules isolées se divisent selon un rythme beaucoup moins rapide que les agrégats; en outre, plus les agrégats sont gros, plus les cellules se divisent rapidement (pour autant qu'il n'y ait pas de régénération).

Nous avons toujours repiqué des quantités suffisantes de tissus, composés à la fois de cellules isolées et d'agrégats, afin de réduire la phase de latence au minimum.

V.4 Evolution de la culture

Lors de l'établissement de la culture, les fragments de cals ont été rapidement entourés d'une couche de nouvelles cellules. Mais, lors des deux premiers passages sur le milieu liquide, il s'est écoulé près de 3 semaines avant qu'une augmentation du nombre d'agrégats et de cellules en suspension ne devienne visible. Nous avons alors transféré la moitié des cultures sur du milieu contenant seulement 0,3 ppm de 2,4-D.

Lors des repiquages suivants, la période de latence sur ces milieux (0,3 ppm de 2,4-D) n'a été que d'une semaine environ, tandis qu'après 3 semaines, toutes les cultures sur milieu avec 4 ppm de 2,4-D s'étaient très peu ou pas du tout développées.

Nous avons donc continué la culture avec 0,3 ppm de 2,4-D seulement et avons abrégé les passages à 4 semaines. Malgré la faible concentration de 2,4-D, les cultures n'ont présenté aucun signe d'organisation. Elles avaient l'apparence de suspensions tout-à-fait opaques, formées de cellules isolées et de petits agrégats, et leur couleur évoluait du jaune au brun plus ou moins foncé au cours de chaque passage. Quelques agrégats contenaient de la chlorophylle.

L'observation microscopique a révélé la présence d'une quantité importante de cellules isolées. Les agrégats sont petits. Les cellules sont pourvues de vacuoles immenses. Plusieurs cellules ont des formes et des dimensions inhabituelles que l'on observe fréquemment dans les cultures de tissus^{104,126} (voir fig. 13).

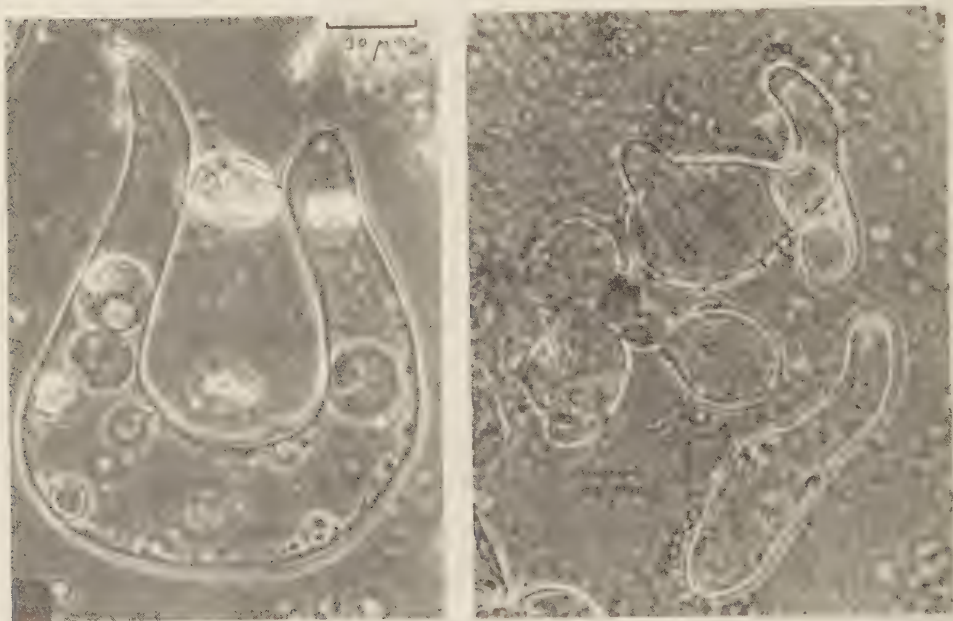
L'apparition de cellules géantes, souvent extrêmement allongées et de faible diamètre peut être attribuée à la polyploïdie des cellules¹³², à la composition du milieu (présence simultanée de 2,4-D et de kinétine)³⁸ ou au vieillissement des tissus (cellules en phase stationnaire)^{126,133}.

Figure 13

Cellules de Digitalis purpurea cultivées en suspension.

Microscope Ultraphot III B, Carl Zeiss.

Contraste de phase



On observe également la présence de quelques cellules réticulées (fig. 14). A l'état actuel de nos recherches, nous ne saurions nous prononcer sur la nature des épaissements observés, que certains auteurs assimilent à une lignification.

Figure 14

Cellules réticulées observées dans les cultures en suspension

de Digitalis purpurea

Microscope Ultraphot III B, Carl Zeiss

Contraste de phase



V.5 Induction d'une organogenèse

V.5.1 Méthode utilisée

Il est bien connu qu'en abaissant la concentration de 2,4-D ou en supprimant totalement ce facteur dans une culture de tissus, on stimule la régénération, le plus souvent de racines^{115,134}.

Nous avons d'abord subdivisé la culture en deux lots, provenant d'une seule fiole :

- 1) milieu contenant 0,3 ppm de 2,4-D
- 2) milieu sans 2,4-D.

Après environ 10 jours de culture sans 2,4-D, nous avons observé un début de différenciation (néoformations cauliformes d'environ 1 mm de long).

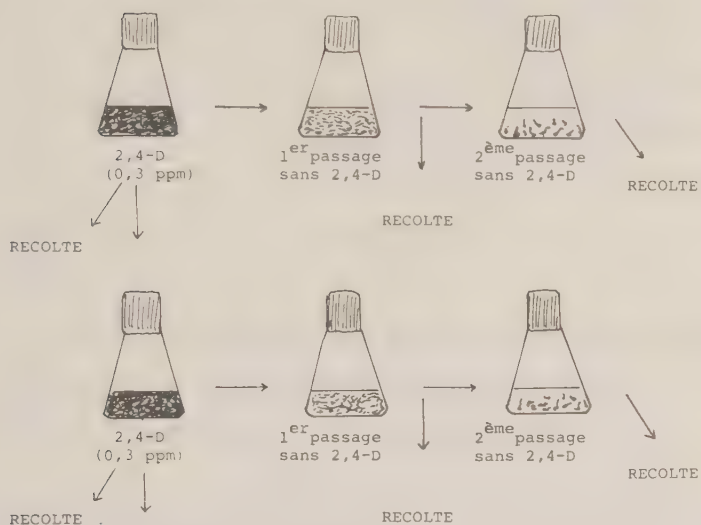
Lors du repiquage suivant, les tissus ont été divisés en 3 lots :

- 1) tissus cultivés avec 2,4-D et repiqués sur milieu avec 2,4-D.
- 2) tissus cultivés avec 2,4-D et repiqués sur milieu sans 2,4-D.
- 3) tissus cultivés sans 2,4-D et repiqués sur milieu sans 2,4-D.

Cette répartition a été répétée à chaque repiquage (figure 15). Les tissus non utilisés pour les repiquages ont été séchés (24 h à 50°) et pesés; les différentes récoltes de chaque type ont été rassemblées.

Figure 15

Diagramme résumant le système de repiquage



V.5.2 Résultats

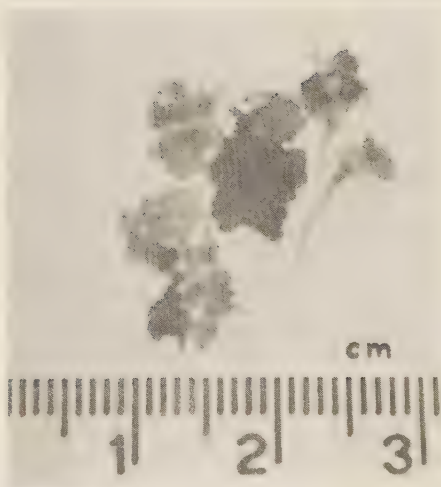
Nous avons obtenu de cette façon 3 types de cultures :

- 1) Culture "mère" : tout-à-fait indifférenciée, composée de cellules isolées et de petits agrégats, formant une suspension opaque.
- 2) Culture mixte, composée d'une part de cellules et d'agrégats de cellules indifférenciés et d'autre part, de petits agrégats présentant un début de régénération de pousses de longueur maximum de 2 mm (figure 16). Cette culture est moins opaque que la précédente.

- 3) Culture ne contenant à la fin du passage que des agrégats de cellules fortement différenciés : les organes formés sont longs de quelques mm à 1,5 cm, presque glabres et contiennent de la chlorophylle (figure 17). Le milieu liquide est totalement limpide, de couleur brun-vert.

Figures 16 et 17

*Agrégats de cellules de Digitalis purpurea
avec début d'organogenèse
Stéréomicroscope IV, Carl Zeiss*



Après 1 passage sans 2,4-D



Après 2 passages sans 2,4-D

L'étude anatomique des tissus différenciés, révèle sans ambiguïté une structure de racine, malgré la présence de chlorophylle au niveau des assises externes.

Nous avons examiné des coupes transversales de ces racines sur toute leur longueur, afin de détecter des éventuelles anomalies. En fait, nous avons eu à faire à des tissus qui ne se distinguent en rien de ceux que l'on aurait prélevé sur une plante normale.

Les coupes au niveau de la zone pilifère sont beaucoup trop fragiles, et il n'est pas possible d'en obtenir des microphotographies utilisables.

Nous reproduisons ici (figure 18) la microphotographie d'une coupe obtenue à mi-distance entre l'extrémité libre de l'organe (méristème apical) et la partie émergeant du tissu amorphe. L'organisation des tissus correspond à celle d'une structure secondaire. Toutefois, deux caractères de la structure primaire persistent encore : des reliquats de l'assise pilifère (r.a.p.) et, immédiatement au-dessous, l'assise subéreuse (a.s.). L'endoderme (end.) est bien visible, mais il ne nous a pas été possible de distinguer les bandes ou les épaissements de Caspary.

Le pachyte est discontinu; la disposition du xylème et du phloème, normale. Le métaxylème est relativement abondant (mét.). Les vaisseaux du type rayé à réticulé sont nettement prédominants, même dans les parties des racines, dont la structure est encore exclusivement primaire.

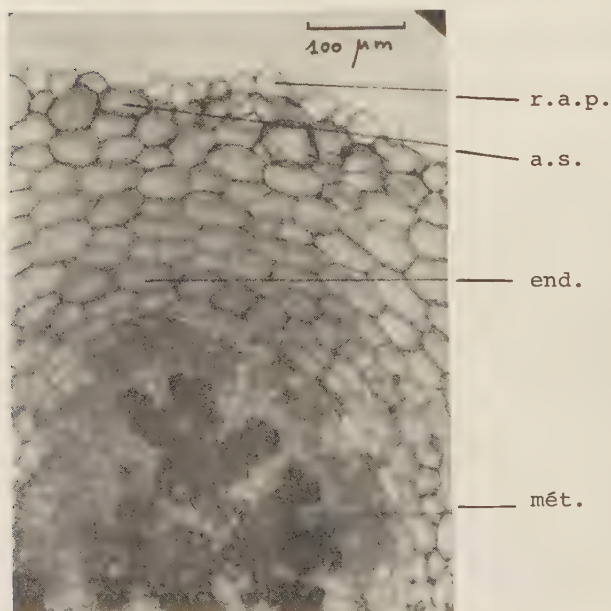
L'ensemble de ces caractères correspond parfaitement au type de la structure secondaire de la racine des Dicotylédones.

Figure 18

Coupe de racine régénérée dans une culture en suspension de

Digitalis purpurea

Microscope Ultraphot III B, Carl Zeiss



En ce qui concerne les différents types de culture en suspension que nous avons obtenus, nous avons observé que le rythme de croissance diminue fortement quand la proportion de tissus différenciés augmente. A chaque repiquage, le rendement en tissu sec, pour un même nombre de fioles, atteint un maximum quand les tissus sont tout-à-fait indifférenciés et un minimum quand les tissus sont très différenciés.

Les trois cultures en milieu liquide ont comme origine la même souche et, de surcroît, elles sont issues du contenu d'une seule fiole. D'autre part, grâce à notre méthode de repiquage, la sélection involontaire d'un mutant est à écarter. Il s'ensuit que les différences observées (aspect et métabolisme) sont dues exclusivement à la présence ou à l'absence de 2,4-D.

L'analyse chimique des tissus ainsi obtenus sera traitée au chapitre suivant.

VI. Analyse qualitative

VI.1 Recherche des hétérosides cardiotoniques

VI.1.1 Matériel analysé

- a) 3 lots de cals de la souche D.P.3 (explantat primaire provenant de la tige, mis en culture le 14 juin 1974) récoltés après culture pendant 3 mois (lot 1), 4½ mois (lot 2) et 6 mois (lot 3) sur *milieu MS*, additionné de 1 ppm de 2,4-D et de 1 ppm de kinétine.
- b) 4 lots de cals de la souche D.P.2 (explantat primaire provenant de la feuille, mis en culture le 6 août 1974) établie sur *milieu MS*, puis divisée en 4 fractions dont chacune a été repiquée pendant 13 mois sur *milieu SH* contenant des quantités croissantes de kinétine : 0 ppm (lot 1), 0,25 ppm (lot 2), 0,5 ppm (lot 3) et 1 ppm (lot 4).
- c) 3 groupes de tissus de la souche D.P.1 cultivés dans le *milieu liquide SH* (cf. chap. V) :
 - 1. cultures de cellules et d'agrégats de cellules indifférenciées (récoltes pendant 8 mois) (lot 1).
 - 2. cultures contenant une faible proportion de racines néoformées (récoltes pendant 5 mois) (lot 2).
 - 3. cultures présentant une forte proportion de racines néoformées (récoltes pendant 5 mois) (lot 3).

VI.1.2 Méthode d'extraction

' La méthode de la Ph.H.VI¹³⁵⁾ a été choisie en raison de sa spécificité. En effet, elle permet d'obtenir un extrait purifié contenant la totalité des cardénolides de la feuille de Digitale.

Dans le cas des cals de la souche D.P.3, nous avons utilisé :

- pour le lot 1 : 67 g de tissus frais
- pour le lot 2 : 76 g de tissus frais
- pour le lot 3 : 118 g de tissus frais.

Afin de prévenir toute action enzymatique indésirable, nous avons broyé ces tissus immédiatement après leur prélèvement, dans un mélange méthanol-acétone (1:1), et conservé la suspension résultante au réfrigérateur (-20°), jusqu'au moment de l'analyse. Nous avons alors filtré cette suspension, évaporé le filtrat sous pression réduite ($t < 60^{\circ}$), puis réuni l'extrait sec et le résidu préalablement filtré. C'est ce mélange que nous avons finalement soumis à l'extraction, selon la méthode citée plus haut.

Dans le cas de la souche D.P.2, nous avons utilisé 1,5 g de cals de chaque lot, séchés pendant 24 h à 50° et pulvérisés finement.

Dans le cas des tissus en suspension, nous avons utilisé :

- pour le lot 1 : 60 g de tissus sec pulvérisé
- pour le lot 2 : 30 g de tissus sec pulvérisé
- pour le lot 3 : 30 g de tissus sec pulvérisé

Tous les extraits purifiés ont été évaporés à sec sous pression réduite, à une température inférieure à 55°.

VI.1.3 Identification

VI.1.3.1 Méthode utilisée

L'identification se fait par chromatographie sur couche mince. La méthode utilisée¹³⁶⁾ est une modification de la méthode de Eide et coll.¹³⁷⁾; elle fait appel à une séparation des hétérosides cardiotoniques sur couche de *kieselguhr G* (0,25 mm) imprégné de formamide, suivie d'une révélation en 3 étapes. Cette méthode se distingue par sa grande sensibilité; elle permet de détecter 5 à 10 ng des dérivés de la gitoxigénine et de la gitaloxigénine (séries B et E) et 50 à 100 ng des dérivés de la digitoxigénine (série A),

Elle prévoit 2 systèmes différents de phase mobile

Premier système de séparation (dérivés peu polaires)

- | | |
|-------------------------|---------|
| - Phase mobile : xylène | 50 vol. |
| malonate d'éthyle | 25 vol. |
| formamide | 1 vol. |

- substances de référence^{a)} :

digitoxine (Dt)	4 mg
digitoxigénine (Dtg)	4 mg
digitoxigénine-bisdigitoxoside (DtgDx ₂)	4 mg
évatromonoside (DtgDx)	4 mg
glucoévatromonoside (DtgDxGl)	4 mg
gitaloxine (Gtl)	1 mg
gitaloxigénine (Gtlg)	1 mg
" -bis-digitoxoside (GtlgDx ₂)	1 mg
lanadoxine (GtlgDx)	1 mg
vérodexine (GtlgDl)	1 mg
gitoxine (Gt)	1 mg
gitoxigénine (Gtg)	1 mg
gitoroside (GtgDx)	1 mg

- solution de référence :

Les quantités précitées des substances de référence ont été dissoutes dans 20 ml du mélange chloroforme-méthanol-formamide (45:45:10)

- volume déposé sur la chromatoplaque :

4 µl (microseringue *Hamilton* type 75 N), soit 0,2-0,8 µl de substance-témoin selon le cas.

Deuxième système de séparation (dérivés polaires)

- phase mobile :

dichlorométhane	60 vol.
tétrahydrofuranne	40 vol.
formamide	11 vol.

a) *Boehringer*, Mannheim

- substances de références^{a)} :

purpuréa-glucoside A (PA) :	4 mg
digitoxigénine-bisdigitoxosido-glucoside (DtgDx ₂ G1)	4 mg
glucoévatromonoside (DtgDxG1)	4 mg
purpuréa-glucoside B (PB)	4 mg
glucogitaloxine (PE)	1 mg

- solution de référence :

Les quantités précitées des substances de références ont été dissoutes dans 20 ml du mélange chloroforme-méthanol-formamide (45:45:10)

- volume déposé sur la chromatoplaque : 4 µl

Toutes les solutions à analyser sont chromatographiées à l'aide des deux systèmes décrits. Elles sont préparées par dissolution de l'extrait purifié dans un volume minimum de solvant (*cf. VI.1.2*), à savoir :

a) extraits des cals de la souche D.P.3 :

lots 1 et 2 :	100 µl du mélange CHCl ₃ -MeOH(1:1)
lot 3	: 200 µl " " " "

Nous déposons sur la chromatoplaque 2 µl de chaque solution.

b) extraits des cals de la souche D.P.2 :

500 µl du mélange CHCl₃-MeOH(1:1)

Nous déposons sur la chromatoplaque 2 µl de chaque solution.

a) *Boehringer, Mannheim*

c) extraits des cultures en suspension :

1,0 ml du mélange CHCl_3 -MeOH (1:1)

Nous déposons sur la chromatoplaque 3 μl et 6 μl de chaque solution.

Les 2 types de chromatogrammes sont révélés de la même façon, selon le schéma suivant¹³⁷⁾ :

Réactifs :

A. acide chlorhydrique 6 N

B. acide p-toluènesulfonique monohydraté	68 g
méthanol	20 ml
péroxyde d'hydrogène (solution à 1% p/v)	2 ml
eau	q.s. pour 100 ml

C. acide L-(+)-ascorbique	0,1 g
acide p-toluènesulfonique monohydraté	2 g
mélange eau-méthanol (1:1)	q.s. pour 100 ml

Après vaporisation de 20 ml de réactif A, on place les chromatoplaques dans une étuve à 120° pendant 15 min., puis on les refroidit rapidement dans un courant d'air. On vaporise alors 15 ml du réactif B, on place les chromatoplaques dans une étuve à 35° pendant 30 min. Enfin, après vaporisation de 15 ml de réactif C, on maintient les chromatoplaques à 35° pendant 45 min.

L'observation se fait à la lumière UV. Les cardénolides apparaissent sous forme de taches fluorescentes, rouges pour les dérivés de la série A et bleues pour ceux des séries B et E.

VI.1.3.2 Résultats

Les chromatogrammes des extraits des cals de la souche D.P.₃, de même que ceux des cals de la souche D.P.₂, ne présentent aucune tache.

Les extraits des tissus cultivés en milieu liquide donnent les résultats suivants :

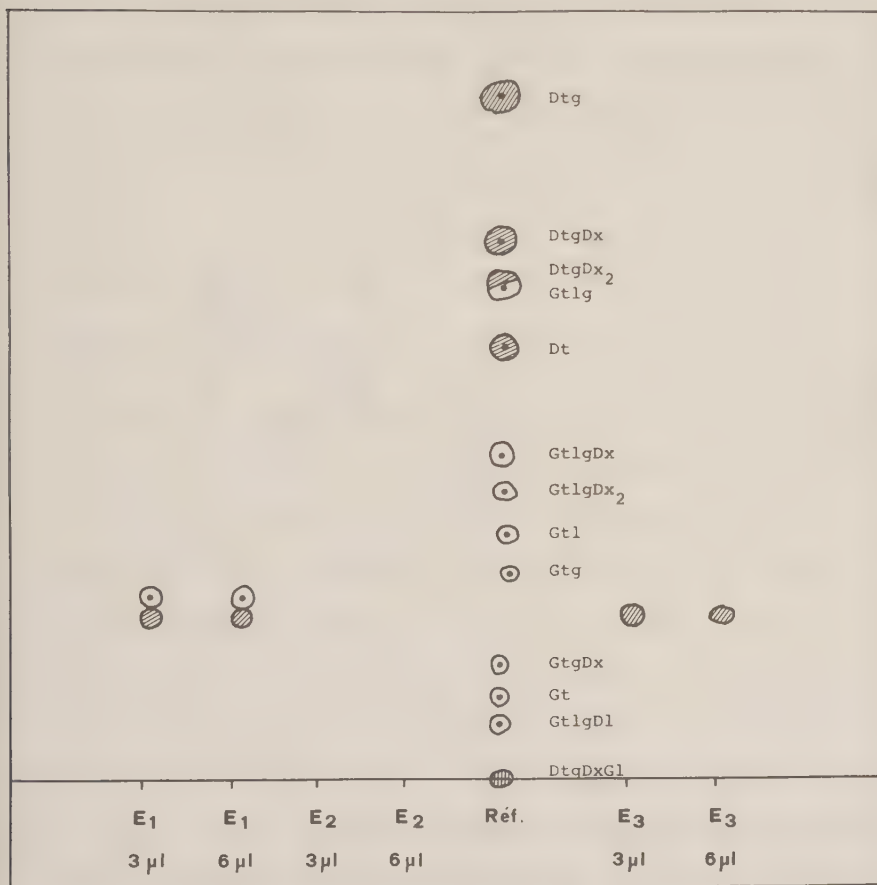
Premier système de séparation (fig. 19) :

Les extraits des lots 1 et 3 (tissus non différenciés et nettement différenciés) contiennent une substance non identifiée dont le R_f relatif par rapport à la digitoxigénine est de 0,24 et qui appartient à la série A; il s'agit selon toute vraisemblance de l'odoroside H. L'extrait du lot 1 présente une deuxième tache non identifiée, dont le $R_{f_{rel.}}$ est de 0,27, et qui appartient à la série B ou E.

Les 2 taches du lot 1 sont très faibles, alors que celle du lot 3 est d'un rouge intense.

Figure 19

*Mise en évidence des hétérosides cardiotoniques
dans les extraits de tissus cultivés en suspension.
Premier système de séparation (dérivés peu polaires).*



fluorescence rouge



fluorescence bleue

E₁ = extrait des tissus non différenciés (lot I)

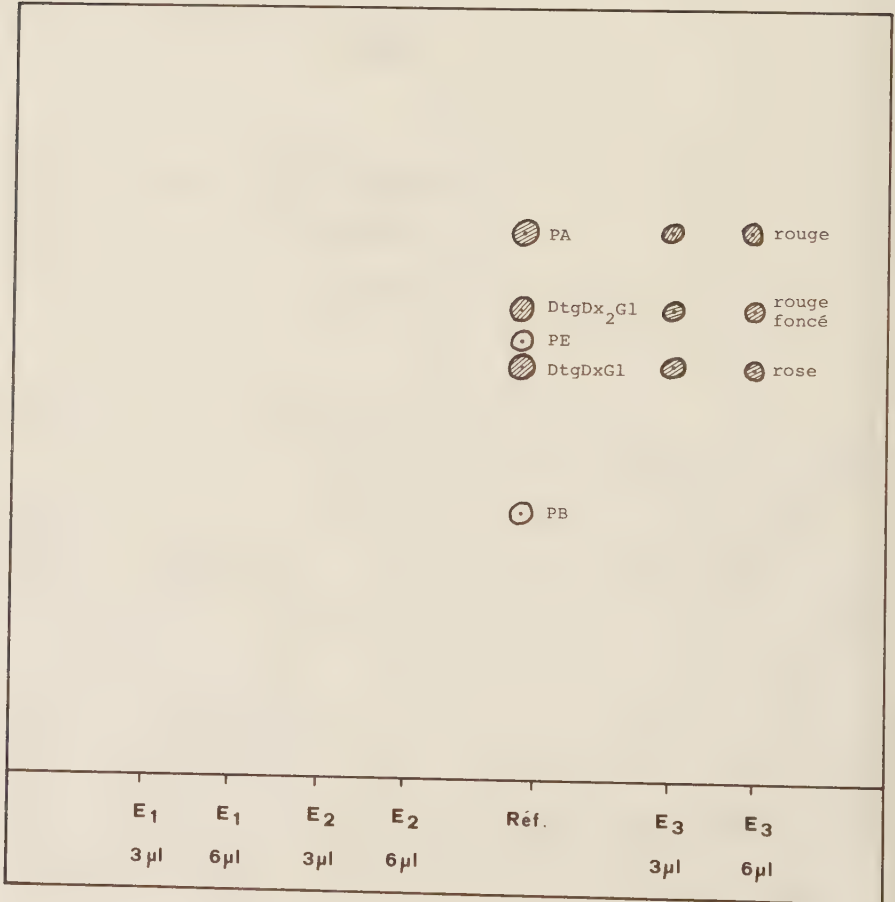
E₂ = extrait des tissus peu différenciés (lot II)

E₃ = extrait des tissus très différenciés (lot III)

(Pour les abréviations, voir p. 115).

Figure 20

*Mise en évidence des hétérosides cardiotoniques
dans les extraits de tissus cultivés en suspension.
Deuxième système de séparation (dérivés polaires).*



 fluorescence rouge

 fluorescence bleue

E₁ = extrait des tissus non différenciés (lot I)

E₂ = extrait des tissus peu différenciés (lot II)

E₃ = extrait des tissus très différenciés (lot III)

(Pour les abréviations, voir p. 116).

Deuxième système de séparation (fig. 20) :

Seul l'extrait du lot 3 (tissus différenciés) contient des cardénolides. Les $Rf_{rel.}$ de ces trois composés (par rapport à PA) sont 0.75, 0.86, et 1,0. Elles correspondent par conséquent au glucoévatromonoside, au digitoxigénine-bisdigitoxosido-glucoside et au purpuréa-glucoside A. Elles présentent une nette fluorescence allant du rose au rouge foncé.

VI.1.4 Analyse de contrôle

VI.1.4.1 Matériel utilisé

Etant donné qu'aucun hétéroside cardiotonique n'a pu être mis en évidence dans les premiers cals récoltés, il nous a paru intéressant de vérifier si les conditions de culture choisies pouvaient inhiber la biosynthèse de ces substances, dans une plante entière.

Dans ce but, nous avons cultivé en tube, sur milieu MS dépourvu de 2,4-D et de kinétine, quelques graines germées stérilement (cf. chap. IV.2.2). Après 6 semaines de culture dans ces conditions, nous avons récolté 29 plantules formées d'une rosette de feuilles de 1 à 2,5 cm de long sur 0,5 à 1,5 cm de large, et de racines. Les feuilles correspondant à 4,2 g de tissus frais ont été extraites et analysées selon les méthodes déjà décrites, parallèlement à 35,0 g de feuilles fraîches provenant de plantes cultivées en pot, en plein air, pendant 1 année et issues du même lot de graines.

VI.1.4.2 Résultats

Les extraits chromatographiés sur couche mince ont donné les résultats représentés dans la fig. 21.

Les plantes cultivées en terre produisent les cardénolides suivants :

digitoxine, gitaloxine, gitoxine, vérodoxine, gluco-évatromonoside, purpuréa-glucosides A et B, glucogitaloxine et deux autres substances non identifiées de la série B ou E.

Les plantes cultivées in vitro produisent : glucoévatromonoside, vérodoxine, glucogitaloxine et trois autres substances non identifiées de la série B ou E.

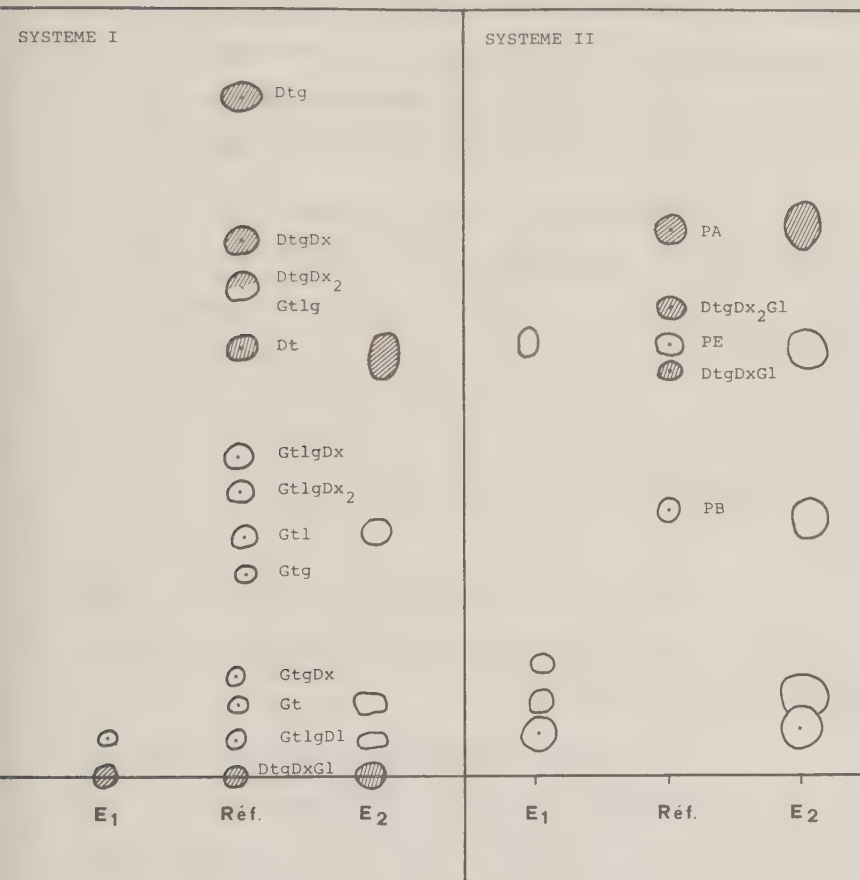
Cette expérience nous a permis de prouver :

- que les conditions artificielles de notre culture n'inhibent que partiellement ou peut-être pas du tout cette synthèse chez la plante entière. (Cette dernière hypothèse serait à vérifier en utilisant des quantités plus grandes de plantes cultivées in vitro).
- que la méthode utilisée est très sensible puisqu'il a été possible de détecter des cardénolides contenus dans une quantité correspondant à moins de 0,3 g de tissu séché.

Figure 21

Mise en évidence des hétérosides cardiotoniques.

Analyse de contrôle.



fluorescence rouge



fluorescence bleue

E₁ = extrait des plantes cultivées in vitro

E₂ = extrait des plantes cultivées en terre

(Pour les abréviations, voir pp. 115 et 116).

VI.1.5 Conclusions

Dans nos conditions de travail, il ne nous a pas été permis de mettre en évidence des hétérosides cardiotoniques dans les tissus indifférenciés, cultivés sur milieu solide. Or, si certains tissus analysés n'ont pu être produits en grande quantité, d'autres par contre ont été récoltés en quantités permettant de détecter des traces de ces substances. De plus l'extrême sensibilité de la méthode a été prouvée.

La culture en milieu liquide de cellules ou d'agrégats de cellules indifférenciées, produit des traces de 2 cardénolides non identifiés. Dans ce cas, le développement rapide des tissus nous a permis de récolter près de 1,5 kg de tissu frais. Les deux substances à peine perceptibles sur notre chromatogramme n'auraient certainement pas pu être révélées si nous avions travaillé avec des quantités plus faibles.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucun cardénolide dans la culture de cellules et d'agrégats de cellules légèrement différenciées.

Par contre, la culture de cellules et d'agrégats de cellules présentant une importante proportion de tissus différenciés a produit plusieurs hétérosides cardiotoniques.

Si nous avons pu supposer au début de ce travail que les conditions de culture choisies étaient le seul responsable de l'inhibition de la biosynthèse des cardénolides, l'expérience a prouvé le contraire.

Bien que cette étude ne soit pas complète, nous pouvons affirmer que, contrairement aux résultats obtenus par quelques chercheurs^{121,123,129,138,139}, les tissus indifférenciés que nous avons cultivés ne contiennent que des quantités à peine perceptibles d'hétérosides cardiotoniques. Dans notre cas, aucun des facteurs ci-dessous n'a semblé déterminant dans la production des cardénolides :

- composition des milieux de culture étudiés
- présence ou absence de kinétine
- culture sur milieu solide ou en suspension
- origine de la souche.

Il faut encore noter que les résultats apparemment contradictoires obtenus par les différents chercheurs ayant approfondi ce sujet, se justifient principalement par la variété des conditions de travail; en effet, des quantités plus ou moins grandes de tissus et des méthodes d'extraction et d'identification plus ou moins spécifiques peuvent amener à des conclusions diamétralement opposées quant à la biosynthèse des hétérosides cardiotoniques par les cultures de tissus.

La présence de plusieurs cardénolides en quantités non négligeables dans les tissus différenciés confirme l'hypothèse émise par *Butcher*¹²⁷, par *Constabel* et coll.³⁹ et par d'autres chercheurs, selon laquelle la biosynthèse de certains métabolites secondaires est liée à l'existence d'une organisation des tissus.

Dans notre cas, c'est l'apparition de racines qui engendre cette biosynthèse, alors que chez la plante entière elle a lieu au niveau des feuilles.

Les résultats obtenus avec les tissus différenciés prouvent que les tissus de Digitale n'ont pas perdu leur faculté de synthétiser des hétérosides cardiotoniques après 3 ans de cultures *in vitro*.

VI.2 Recherche des stérols

La connaissance de la nature des stérols élaborés par les tissus de Digitale, revêt un caractère particulièrement important, du fait que ces substances sont impliquées dans les processus de biosynthèse qui conduisent d'une part aux saponines et d'autre part aux hétérosides cardiotoniques, par l'intermédiaire de dérivés du prégnane.

Nous avons donc estimé qu'il était indispensable de déterminer la nature des stérols élaborés par les tissus cultivés *in vitro*, et d'en suivre l'évolution en fonction des conditions de culture. Rappelons à ce sujet que l'étude de ces conditions portait sur 24 combinaisons des facteurs souche, milieu nutritif et concentration de kinétine (cf IV.5.2).

IV.2.1 Matériel analysé

- A. Etant dans l'impossibilité d'effectuer toutes ces cultures simultanément sur grande échelle, nous ne disposions que de quantités restreintes de matériel végétal

à chaque repiquage. Ceci nous a amené à élaborer une méthode d'extraction et d'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG), qui nous a fourni des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs, et ceci non seulement pour les stérols, mais encore pour les sapogénines et les stéroïdes dérivés du prégnane.

Les 24 tissus différents analysés selon cette méthode sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Souche	Milieu de culture	Concentration en kinétine (ppm)	Nombre de passages sur ce milieu	Age de la culture (mois)
D.P.1	MS	0/0,25/0,5/1	4	12
	SH	0/0,25/0,5/1	4	12
D.P.2	MS	0/0,25/0,5/1	4	10
	SH	0/0,25/0,5/1	4	10
D.P.3	MS	0/0,25/0,5/1	4	11
	SH	0/0,25/0,5/1	4	11

B. Il est évident que les temps de rétention que l'on peut calculer à partir des chromatogrammes, ne constituent pas à eux seuls une preuve absolue de la présence des substances recherchées. Aussi, pour contrôler les données de ces premières analyses, avons-nous eu recours à un certain nombre de méthodes tout-à-fait différentes

de la chromatographie en phase gazeuse. Ces méthodes exigeant des quantités de matériel relativement élevées, nous avons constitué à cet effet un échantillon suffisant à partir d'un ensemble de cals cultivés dans des conditions différentes. Les caractéristiques de cet ensemble sont les suivantes :

Souche : D.P.3

milieu de culture : SH

concentration en kinétine : 0, 0,25, 0,5 et
1,0 ppm

tissus prélevés pendant 5 mois, du 26^e au
31^e mois de culture.

Les tissus ainsi prélevés ont été séchés comme ceux de la série A, rassemblés et pulvérisés finement.

VI.2.2 Méthodes d'extraction

A. Pour la première série de tissus (cf. chap. VI.2.1, A), nous avons mis au point une méthode d'extraction et d'analyse qui nous a permis d'identifier et de doser simultanément :

1) l'ensemble des stérols présents à l'état libre,
sous forme d'esters ou sous forme d'hétérosi-
des^{70,140-143},

2) l'ensemble des sapogénines et des saponines¹⁴⁴, et

- 3) les stéroïdes considérés comme les précurseurs immédiats des hétérosides cardiotoniques : prégnénolone, progestérone, prégnanediol-3,20.

A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de méthode d'extraction simultanée de ces 3 catégories de produits. Une seule publication¹⁴⁵ fait mention d'un dosage simultané des stérols et des sapogénines dans du matériel végétal, sans indications précises sur la méthode d'extraction utilisée dans ce but.

Les méthodes d'extraction et de dosage sélectif des stérols dans les végétaux sont par contre très nombreuses, mais les techniques proposées ne nous ont pas donné satisfaction, puisque nous étions intéressé par l'extraction de la totalité des stérols. En effet, certains auteurs n'hydrolysent pas les formes hétérosidiques^{70,146} alors que d'autres ne saponifient pas les formes estérifiées^{55,147,148}. Enfin, plusieurs auteurs isolent les stérols par précipitation à la digitonine^{149,150}. Ce procédé est évidemment inutilisable dans notre cas.

L'intérêt commercial que présentent certaines sapogénines, a poussé de nombreux chercheurs à mettre au point des méthodes rapides d'extraction et d'identification¹⁵¹⁻¹⁵⁶; certaines de ces méthodes ont été conçues pour l'extraction de très grandes quantités¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ et ne peuvent être transposées aux conditions propres à notre travail. La précipitation des saponines par le cholestérol est une méthode fréquemment utilisée¹⁵⁹⁻¹⁶¹ pour sa rapidité, mais elle n'est pas quantitative¹⁶².

Dans la plupart des cas, les saponines sont extraites sous forme d'aglycones, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique.

L'étude de la littérature ayant trait aux méthodes d'extraction nous a fourni les éléments nécessaires grâce auxquels nous avons mis au point un mode opératoire permettant d'extraire quantitativement les stérols (libres, à l'état d'hétérosides et estérifiés), les sapogénines et les autres stéroïdes typiques de la Digitale pourpre.

Marche à suivre :

Pulvériser finement environ 1 g de cals séchés et peser la poudre obtenue à 1 mg près. Placer le matériel végétal dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux et contenant 60 ml du mélange : acide chlorhydrique (37 %) - méthanol-eau (1:1:1). Chauffer le contenu du ballon à ébullition pendant 2 heures (hydrolyse selon Cowley et Coll.¹⁶³). L'addition de quelques gouttes de n-décanol est nécessaire pour éviter la formation de mousse. Neutraliser la solution par addition de bicarbonate de sodium ($\text{pH} \approx 7$). Transférer la solution dans une capsule de porcelaine de 15 cm de diamètre et ajouter environ 3 g de chlorure de sodium. Evaporer le contenu de la capsule à sec, en plaçant dans une étuve à circulation d'air chaud (60°) et en agitant fréquemment la masse des cristaux qui se forme. Extraire le résidu séché pendant 8 heures avec 200 ml du mélange chloroforme-méthanol-tétra-

hydrofuranne (1:1:1) dans un appareil de Soxhlet. Evaporer l'extrait à sec sous pression réduite, à environ 55°. Procéder à la saponification des stérols estérifiés selon Evans⁷⁰ : ajouter au résidu sec 80 ml d'une solution éthanolique à 6 % (p/v) d'hydroxyde de potassium (éthanol à 90 %), et maintenir le mélange à ébullition pendant 3 heures (réfrigérant à reflux). Concentrer le produit de saponification à 10 ml, sous pression réduite, à environ 55°, et ajouter au liquide un volume égal d'une solution aqueuse à 15 % de carbonate de sodium (p/v). Extraire les stérols par 2 portions de 20 ml d'éther de pétrole (redistillé, fraction 35°-75°) et les sapogénines par 4 portions de 20 ml du mélange chloroforme-méthanol (8:2). Grâce à la présence de carbonate de sodium, les phases se séparent nettement et l'alcali n'est pas entraîné dans la phase organique. Rassembler et filtrer toutes les phases organiques, puis évaporer le mélange à sec sous pression réduite. Conserver le résidu de l'extraction au congélateur dans des ballons de 5 ml, hermétiquement fermés.

Cette méthode permet d'extraire environ le 90 % des stérols et des sapogénines contenus dans les tissus.

B. Pour la deuxième série de tissus, nous avons suivi la méthode utilisée par Evans⁷⁰ pour l'étude des stérols des graines de *Digitalis purpurea*, en y apportant toutefois quelques modifications de détail.

Marche à suivre :

Pulvériser 35,0 g de tissus séchés et les extraire dans un appareil de Soxhlet pendant 20 heures avec 200 ml d'éther de pétrole (redistillé, fraction 35°-75°). Evaporer le solvant, reprendre la phase huileuse qui en résulte par de l'acétone, et filtrer la solution sur colonne de célite (célite : 35 g, diamètre intérieur de la colonne : 3 cm). Eluer avec de l'acétone (environ 400 ml) et évaporer l'éluat à sec. Reprendre le résidu avec 100 ml d'une solution éthanolique à 6 % (p/v) d'hydroxyde de potassium, maintenir le mélange à ébullition pendant 3 h (réfrigérant à reflux) et diluer le produit de saponification à 500 ml avec une solution aqueuse de sulfate d'ammonium à 1 %. Extraire la fraction non saponifiable par 3 portions de 100 ml d'éther et évaporer à sec les extraits réunis. Chromatographier le résidu sec (environ 150 mg) sur colonne d'oxyde d'aluminium (*Merck*, degré d'activité II-III selon *Brockmann* ; diamètre intérieur de la colonne : 1 cm), en éluant selon la méthode de *Williams, Goad et Goodwin*⁷⁶, avec des fractions de 150 ml d'éther de pétrole additionné de quantités croissantes d'éther : 0, 2, 4, 6, 8, 15 et 20 % (vol/vol).

En suivant ce mode opératoire, nous avons obtenu 7 fractions que nous avons évaporées à sec. Les fractions 5 et 7 (8 et 20 % d'éther) ont fourni un résidu cristallin. Nous avons chromatographié les 7 résidus sur gel de silice H⁷⁰ (épaisseur 0,25 mm, activation 30 min à 110°, phase mobile : chloroforme-

diisopropyléther : 98:2, révélation : chlorure d'antimoine-III 10 % dans du benzène, chauffage 10 min à 120⁰, observation à la lumière UV). Nous avons distingué 3 groupes de substances sur le chromatogramme. Le premier ($R_f \approx 0,64$ à 0,88) est présent dans les 3 premières fractions (0,2, 4 % d'éther); le deuxième ($R_f \approx 0,28$ à 0,64) dans les fractions contenant 6, 8, 15 % d'éther; le troisième ($R_f \approx 0,25$) dans la fraction contenant 20 % d'éther : celle-ci ne présente qu'une tache dont le R_f est identique à celui du cholestérol utilisé comme référence.

VI.2.3 Méthodes d'identification

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode de choix pour le dosage des stérols dans le matériel végétal. Elle peut également servir à l'identification de ces substances dans des mélanges naturels complexes, mais les résultats doivent être confirmés dans ce cas à l'aide d'une autre méthode physicochimique.

Le recours à la chromatographie sur couche mince (CCM)^{55,146,147,164} représente un de ces moyens de confirmation. La transformation préalable des stérols en acétates^{165,166} est recommandée dans ce cas par la plupart des auteurs. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG-SM) reste naturellement le meilleur moyen d'identification^{70,76,147,167,169}. Enfin, l'utilisation de 3 phases stationnaires diffé-

rentes en CPG peut également conduire à une identification sûre¹⁷⁰. Pour confirmer les résultats fournis par la CPG, nous avons utilisé la spectrométrie de masse.

VI.2.3.1 Chromatographie en phase gazeuse

A. Préparation des dérivés

Les stérols peuvent être analysés par chromatographie en phase gazeuse sans transformation préalable^{149, 171, 172}. Toutefois, les séparations obtenues par cette méthode laissent à désirer, et les traînées des pics sont importantes. De plus, les sapogénines n'apparaissent pas sur les chromatogrammes dans ces conditions, à cause de leur volatilité pratiquement nulle. C'est pourquoi nous avons transformé le contenu stéroïdique de nos extraits en dérivés volatils.

Les dérivés les plus fréquemment utilisés dans ce but, sont les acétates (stérols^{70, 76, 170}, sapogénines^{59, 157}) et les triméthylsilyléthers (stérols^{171, 173, 174}, sapogénines^{58, 73, 108}).

Nous avons opté pour la transformation en triméthylsilyléthers, à cause de la simplicité et de la rapidité des opérations qu'elle implique.

Les stérols produits par la Digitale, possèdent tous un seul groupement hydroxyle, en 3 β , et peuvent être silylés quantitativement à la température ambiante avec la plupart des réactifs de silylation^{173, 175}.

Les sapogénines, et surtout la digitogénine qui

est trihydroxylée en 2 α , 3 β et 15 β , sont moins faciles à silyler. Après avoir essayé différents réactifs de silylation préconisés pour les stéroïdes^{175,176} ou plus spécialement pour les sapogénines¹⁶³, en faisant varier chaque fois les conditions de la réaction (proportion réactif-solvant, durée et température), nous avons choisi la méthode suivante :

réactif : N,O-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide
(BSTFA)^{a)} + 1 % de triméthylchlorosilane
(TMCS) comme catalyseur : 1,60 ml

solvant : pyridine anhydre^{b)} : 0,80 ml.

On place l'extrait sec (env. 200 mg) et les réactifs dans un flacon hermétiquement fermé, on agite, puis on chauffe 2 h à 60°.

La présence de pyridine est nécessaire à la réaction. Le chauffage ne conduit pas à la formation de produits de dégradation. La silylation est quantitative.

B. Appareillage

Chromatographe : Perkin-Elmer 3920.

Détecteur : à ionisation de flamme.

Enregistreur : Hitachi-Perkin-Elmer 56.

a) *Pierce Chemical Co.*

b) *E. Merck*, qualité pour analyse, purifiée et déshydratée selon la méthode classique¹⁷⁷ : chauffer à reflux 2,5 h sur de l'oxyde de baryum anhydre, puis distiller sous pression normale. La pyridine obtenue est incolore. Elle est conservée au frais (4°C) et à l'abri de la lumière, sur tamis moléculaire (4Å).

C. Phases stationnaires

Pour la chromatographie des dérivés silylés des stérols et des sapogénines, l'utilisation de phases non polaires ou très peu polaires s'impose. Les graisses de silicone représentent un des groupes les plus utilisés de phases stationnaires, du fait de leur pouvoir dissolvant, leur inertie chimique, leur faible pression de vapeur et leur bonne stabilité thermique. La polarité de ces silicones est une fonction de leur degré de substitution. Les silicones non polaires comme le SE-30^{59,163,178-180}, l'OV-1⁷³ ou l'OV-101^{73,171}, dont les substituants sont composés à 100 % de groupements méthyle, ou peu polaires comme le SE-52¹⁷³ (substituants : 5 % phényle et 95 % méthyle), l'OV-17^{58,108,147} (substituants : 50 % phényle) ou l'OV-22¹⁷¹ (substituants : 65 % phényle) sont les phases les plus fréquemment utilisées pour la séparation des sapogénines et des stérols. Le QF-1, silicone de polarité moyenne, est utilisé plus rarement^{57,167,170}.

Après différents essais avec les phases les plus usuelles, nous avons choisi l'OV-17 à 5 %, grâce auquel nous avons obtenu une très bonne séparation de la progestérone, des stérols et des sapogénines (figure 22).

L'OV-17, malgré sa réputation de thermostabilité, n'a pu être utilisé pour la spectrométrie de masse couplée à la CPG, en raison de l'importance du bruit de fond qui rend les spectrogrammes illisibles. Nous avons donc dû chercher une phase

Figure 22
Chromatogramme en phase gazeuse
Séparation sur colonne d'OV-17 à 5%

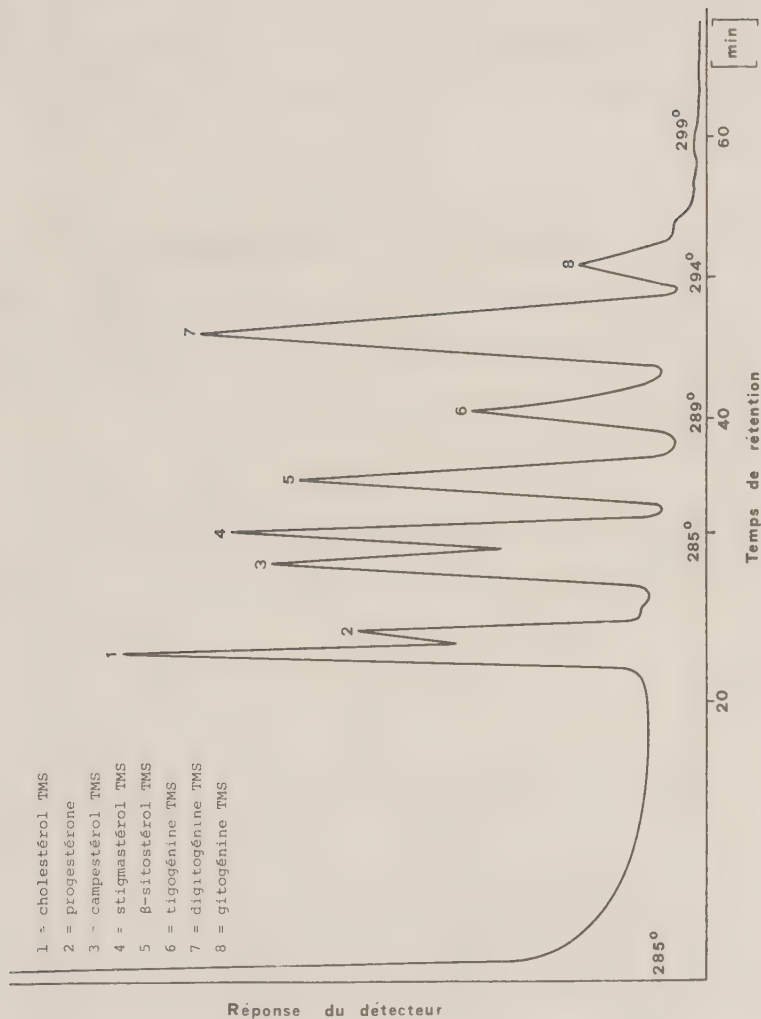
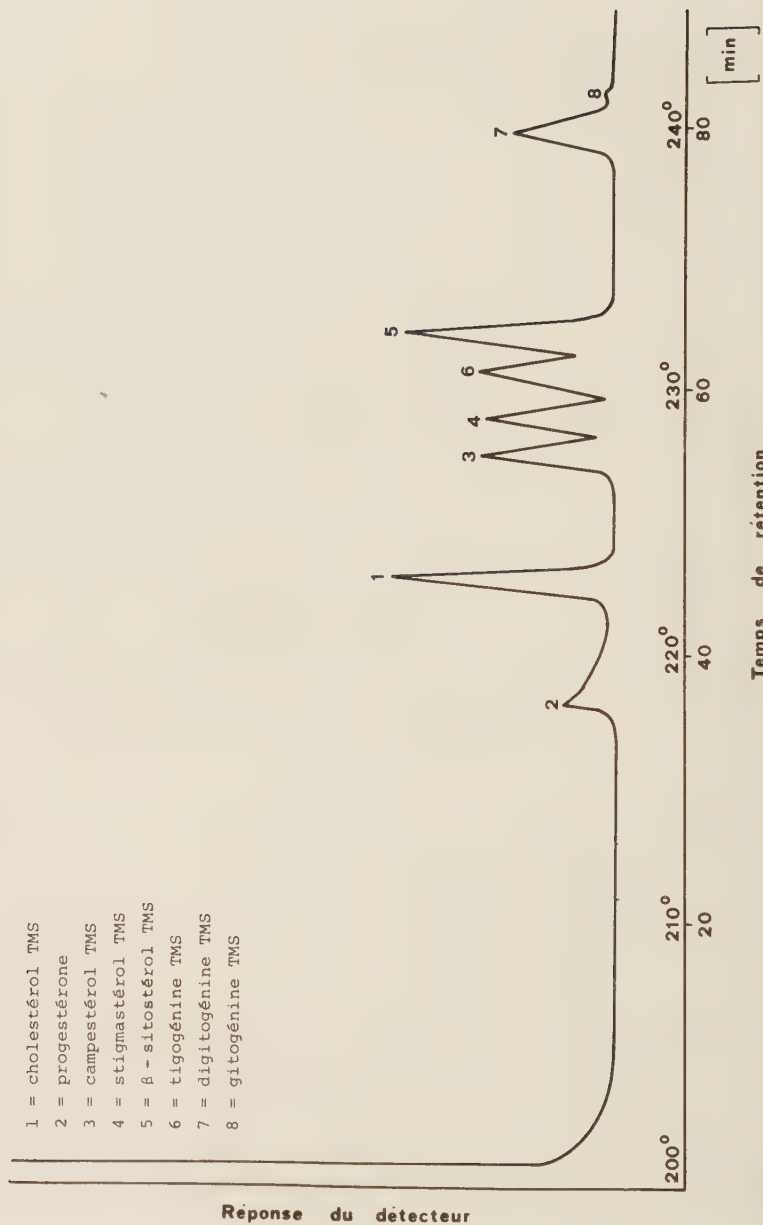


Figure 23

Chromatogramme en phase gazeuse

Séparation sur colonne de Dersil-300 à 1%



stable à haute température et de faible polarité. Le Dexsil-300 (un polycarborane-siloxane) qui est stable jusqu'à 450⁰, répond parfaitement à ces exigences. Cette phase, qui est particulièrement indiquée pour la CPG couplée à la spectrométrie de masse^{166, 174, 181}, nous a permis d'obtenir à nouveau une très bonne séparation (figure 23).

Tant avec le Dexsil-300 qu'avec l'OV-17, nous avons dû recourir à des températures programmées, pour obtenir des séparations satisfaisantes. Pour l'analyse avec l'OV-17, nous avons dû utiliser une colonne de compensation, ce qui n'a pas été nécessaire avec le Dexsil-300.

D. Conditions de travail

De nombreuses mises au point nous ont conduits à adopter les conditions définitives suivantes pour l'analyse de tous les extraits :

Séparation sur OV-17

Colonnes : verre, longueur : 4 m
diamètre intérieur : 2,25 mm.

Phase stationnaire :

OV-17^{a)} 5 %, sur Chromosorb G^{b)} AW DMCS,
80-100 mesh

densité apparente de la phase tassée :
0,54 g/ml.

a) Applied Science Laboratories Inc.

b) Johns-Manville, Colorado, USA.

Programmation :

32 min isotherme à 285° , puis programmation de $0,5^{\circ}/\text{min}$ jusqu'à 320° .

Chambre d'injection :

température : 330° .

Détecteur (double) :

température : 330°

pression d'hydrogène : $1,8 \text{ kg/cm}^2/\text{détecteur}$

pression d'air synthétique : $3,5 \text{ kg/cm}^2/\text{détecteur}$.

Gaz vecteur :

hélium

débit : 30 ml/min.

Enregistrement :

1 mV ; vitesse de déroulement du papier :

pour l'analyse qualitative : 5 mm/min,

pour l'analyse quantitative : 20 mm/min.

Microseringue :

Hamilton, type 85 RNE ($5 \mu\text{l}$) et 801 RNE ($10 \mu\text{l}$).

Séparation sur Dexsil-300

Colonne : verre, longueur : 180 cm

diamètre intérieur : 2,25 mm.

Phase stationnaire :

Dexsil-300^{a)} 1 % sur Supelcoport^{a)},
100-120 mesh.

Programmation :

0,5°/min de 200 à 260°.

Chambre d'injection :

température : 330°.

Détecteur :

température : 330°

pression d'hydrogène : 1,5 kg/cm²

pression d'air synthétique : 3,0 kg/cm².

Gaz vecteur :

hélium

débit : 35 ml/min.

Enregistrement :

1 mV ; vitesse de déroulement du papier :

5 mm/min.

VI.2.3.2 Spectrométrie de masse

Etant donné la complexité de la composition des extraits végétaux, la spectrométrie de masse associée à la chromatographie en phase gazeuse est une des méthodes les plus rapides et les plus sûres pour l'identification des différents constituants. Cependant, l'étude de composés de poids moléculaire aussi important que celui des stérols et des sapogénines (400-600), qui nécessitent le recours à des températures de séparation

a) Supelco Inc, Pennsylvanie, USA.

relativement élevées, ne va pas sans poser certains problèmes^{a)}. Par exemple, seuls les composés que nous avons pu extraire en grande quantité ont pu être identifiés de cette façon.

Appareillage

Chromatographie : Perkin-Elmer 900 (avec détecteur à ionisation de flamme).

Séparateur : Biermann.

Spectromètre de masse :
Hitachi-Perkin-Elmer RMU-6L.

Conditions de travail

Chromatographie : séparation sur Dexsil-300 1 % (détails : cf. chap. VI.2.3.1, à l'exception du débit d'hélium : 30 ml/min).

Spectrométrie de masse :
enregistrement : 75 eV
courant d'émission : 50×10^{-6} Ampères
pression : $3 \text{ à } 4 \times 10^{-6}$ Torr
température de la source : 250°
accélération : 4,8 kV.

a) Les spectres de masse ont été obtenus par le Prof. R. Tabacchi, de l'Université de Neuchâtel, qui a également bien voulu nous faire bénéficier de sa grande expérience en matière d'interprétation.

VI.2.3.3 Réaction colorée

Pour l'identification des stérols, on se sert d'un certain nombre de réactions colorées obtenues par l'action d'acides forts.

La plus courante de celles-ci est la réaction de *Liebermann-Burchard* (mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique¹⁸²). Elle a fait l'objet de nombreuses modifications dont celle de *Moore et Baumann*¹⁸³ qui a été développée par *Cowley et coll*¹⁴⁰ pour le dosage spectrophotométrique des Δ^5 et Δ^7 stérols. Elle fournit les colorations caractéristiques suivantes⁷⁶ :

bleue,	apparaissant très rapidement :
	Δ^7 ou Δ^8 stérols
verte,	apparaissant après plusieurs minutes :
	Δ^5 stérols
jaune-orange,	intensité croissante en fonction du temps :
	diméthyl-4,4'-stérols
jaune,	cycloeucalénol.

A l'aide de cette méthode, nous avons analysé les 7 fractions obtenues après séparation sur colonne d'oxyde d'aluminium (cf. chap. VI.2.2.B).

Mode opératoire

Les extraits sont dissous dans de l'acide acétique glacial et conservés à 25° pendant 30 min avant la réaction.

Le réactif, une solution à 5 % d'acide sulfurique dans l'anhydride acétique, est également préparé à l'avance et conservé 30 à 40 min à 25^O. Les 2 solutions sont alors mélangées. L'observation se fait après 1 ou 2 min, puis après 1 heure et après quelques heures.

VI.2.4 Résultats et discussion

1) Nous avons chromatographié les 24 extraits des calcs de *Digitalis purpurea* (cf. chap. VI.2.1.A), sur OV-17 à 5 % en alternance avec des solutions de référence contenant les stérols normalement élaborés par cette plante, à savoir le cholestérol, le campestérol, le stigmastérol et le β -sitostérol. Tous les chromatogrammes présentent 4 pics dont les temps de rétention (TR) concordent parfaitement avec ceux des substances de référence (tableaux 11 à 13).

Quelques-uns de ces extraits, chromatographiés sur Dexsil-300 à 1 %, ont donné des résultats tout à fait comparables (tableau 14). Ces premiers résultats nous permettent de penser que tous les extraits analysés contiennent les 4 stérols mentionnés.

2) L'extrait global des calcs de la souche D.P.3 (cf. chap. VI.2.1 B) avait été subdivisé en 7 fractions par chromatographie sur colonne (cf. chap. VI.2.2). Selon Williams et coll.⁷⁶, on devrait pouvoir séparer par cette méthode les diméthyl-4,4'-stérols (fractions contenant 4 et 6 % d'éther), les

CPG sur colonne d'OV-17 à 5% des extraits de cales de la SOUCHE D.P.1

 $TR_{relatifs}$ des triméthylsilylés (β-sitostérol = 1)

Milieu de culture	Concentration de kinétine (ppm)	cholestérol	progestérone	campésterol	stigmastérol	β-sitostérol	X ₁	tigogénine	X ₂	X ₃	gítogénine	X ₄	X ₅	X ₆
MS	0,00	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,28	1,37	1,45	1,59	1,71	1,92
"	0,25	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,27	1,36	1,45	1,60	1,71	1,92
"	0,50	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,16	1,28	1,38	1,47	1,59	1,72	1,93
"	1,00	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,16	1,28	1,38	1,46	1,58	1,71	1,93
Référence		0,65	0,69	0,83	0,89	1,00*	---	1,15	1,30 digitog.		1,45			
SH	0,00	0,65	0,68	0,83	0,89	1,00	---	1,16	1,29	1,38	1,45	1,58	1,71	1,93
"	0,25	0,65	---	0,83	0,89	1,00	---	1,16	1,28	1,38	1,46	1,58	1,72	1,93
"	0,50	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,27	1,35	1,44	---	1,69	1,89
"	1,00	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,29	1,37	1,45	---	1,72	1,93

* 33,05 min

Tableau 12

CPG sur colonne d'OV-17 à 5% des extraits de cals de la SOUCHE D.P.2

$TR_{relatifs}$ des triméthylsilyléthers (β -sitostérol = 1)

Milieu de culture	Concentration de kinétine (ppm)	cholé- stérol	progé- stérol	campé- stérol	stigma- stérol	β -sito- stérol	x_1	tigo- génine	x_2'	x_3	gito- génine	x_4	x_5	x_6
MS	0,00	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,26	1,34	1,43	---	1,67	1,88
"	0,25	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,26	1,35	1,43	---	1,67	1,90
"	0,50	0,65	0,69	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,26	1,35	1,44	---	1,67	1,90
"	1,00	0,65	0,69	0,82	0,89	1,00	1,08	1,15	1,27	1,35	1,44	---	1,69	1,91
Référence		0,65	0,69	0,83	0,89	1,00*		1,15	1,29 digitag.		1,44			
SH	0,00	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,25	1,36	1,43	1,59	1,69	1,81
"	0,25	0,65	0,68	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,26	1,36	1,45	1,58	1,70	1,91
"	0,50	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,27	1,36	1,44	1,58	1,70	1,91
"	1,00	0,65	0,68	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,27	1,36	1,45	---	1,70	1,92

* 35,0 min

TR relatifs des triméthylsilyléléthers (β -sitostérol = 1)

Milieu de culture	Concentration de kinétine (ppm)	cholestérol	progestérone	campésterol	stigma-sterol	β -sitostérol	X ₁	tigogénine	X ₂	X ₃	gítogénine	X ₄	X ₅ ^a	X ₆
MS	0,00	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,16	1,28	1,36	1,46	---	1,72	1,95
"	0,25	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,28	1,35	1,45	1,62	1,71	1,94
"	0,50	0,65	0,70	0,82	0,89	1,00	---	1,15	1,28	1,37	1,45	---	1,72	1,95
"	1,00	0,65	---	0,83	0,89	1,00	1,09	1,15	1,27	1,36	1,46	---	1,72	1,94
Référence		0,65	0,69	0,83	0,89	1,00*		1,15	1,30 digitox.		1,45			
SH	0,00	0,65	---	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,29	1,36	1,45	---	1,71	1,93
"	0,25	0,66	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,14	1,24	1,35	1,43	1,55	1,68	1,87
"	0,50	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,16	1,28	1,38	1,45	---	1,72	1,93
"	1,00	0,65	0,69	0,83	0,89	1,00	---	1,15	1,29	1,38	1,46	1,60	1,73	1,94

* 32,33 min

Tableau 14

CPG sur colonne de Dersil-300 à 1% de quelques extraits de cals
des SOUCHES D.P.1, D.P.2, D.P.3

TR relatifs des triméthylsilyléthers (β -sitostérol = 1)

Souche	Milieu de culture	Concentration de kinétine (ppm)	progé- stérone	cholé- stérol	campé- stérol	stigma- stérol	tigo- génine	β -sito- stérol	X_1'	X_2	X_3	gito- génine	X_4	X_5
D.P.1	MS	0,00	0,55	0,70	0,85	0,89	0,95	1,00	1,04	1,16	1,25	1,29	---	1,43
"	"	0,25	0,55	0,70	0,85	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,22	1,27	1,33	1,40
D.P.1	SH	0,25	0,55	0,71	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,23	1,27	---	---
"	"	0,50	0,56	0,71	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,23	1,28	1,34	---
Référence			0,56	0,70	0,86	0,90	0,95	1,00*			1,25 digitog.	1,28		
D.P.2	MS	0,00	0,55	0,70	0,85	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,23	1,28	1,33	1,40
"	"	0,50	0,55	0,70	0,85	0,89	0,94	1,00	1,04	1,14	1,22	1,27	1,33	---
D.P.2	SH	0,00	0,54	0,70	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,24	1,27	---	---
"	"	0,50	0,55	0,70	0,85	0,89	0,95	1,00	1,05	1,14	1,22	1,26	1,33	---
Référence			0,53	0,71	0,86	0,90	0,95	1,00**			1,25 digitog.	1,27		
D.P.3	MS	0,50	0,54	0,70	0,85	0,89	0,94	1,00	1,04	1,14	1,22	1,27	1,34	1,40
"	SH	0,00	0,56	0,71	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,23	1,28	1,34	1,40
D.P.3	SH	0,50	0,55	0,71	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,14	1,23	1,28	---	---

* 62,5 min

** 63,5 min

méthyl-4 α -stéroïls (6 et 8 % d'éther) et les diméthyl-4-stéroïls (15 et 20 % d'éther). Enfin, les méthyl-4-stéroïls et les diméthyl-4,4'-stéroïls, devraient apparaître sur les chromatogrammes en phase gazeuse après le cholestérol.

Nous avons silylé, puis chromatographié toutes ces fractions sur les deux types de phase stationnaire cités plus haut. D'autre part, nous avons traité une partie de ces mêmes fractions par le réactif de *Liebermann-Burchard*. Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Le chromatogramme de la *première fraction* (0 % d'éther) ne présente aucun pic dans l'intervalle d'élution des stéroïls.
- Les chromatogrammes des *fractions 2 - 4* (2, 4 et 6 % d'éther) présentent les pics du cholestérol et du campestérol, mais aucun pic correspondant à un temps de rétention plus élevé.

Ces 4 premières fractions, rassemblées, ont donné une coloration jaune d'intensité croissante avec le réactif de *Liebermann-Burchard* : cette coloration pourrait être due à des diméthyl-4,4'-stéroïls ou au cycloeucalénol, mais cette hypothèse est à écarter au vu des résultats de la chromatographie en phase gazeuse.

- Le chromatogramme de la *cinquième fraction* (8 % d'éther) présente, outre les pics du cholestérol, campestérol, stigmastérol et β -sitostérol, 4 pics extrêmement importants, non identifiés, apparaissant après le β -sitostérol sur l'OV-17 comme

sur le Dexsil-300 (TR_{rel} par rapport au β -sitostérol, sur OV-17 : 1,07/1,19/1,29/1,62, sur Dexsil-300 : 1,07/1,10/1,19/1,35).

La réaction de *Liebermann-Burchard* donne lieu d'abord à une coloration mauve foncée qui passe au vert très intense après quelques minutes. Cette coloration persiste pendant plusieurs heures. L'intensité de la coloration verte, qui est due à la présence des Δ^5 -stérols, laisse supposer que ceux-ci se trouvent en forte quantité et que, en plus du cholestérol, campestérol, stigmastérol et β -sitostérol, le mélange analysé contient d'autres Δ^5 -stérols. Dans ce cas, il pourrait s'agir du méthylène-24-cholestérol, du fucostérol ou de l'isofucostérol, mais cette hypothèse reste à vérifier.

Une partie de cette fraction de stérols a été acétylée en vue de l'examen par spectrométrie de masse.

L'analyse par SM des substances acétylées, dont les dérivés silylés correspondent aux TR_{rel} de 1,07 et 1,10 sur Dexsil-300, a donné les résultats suivants :

- substance "1,07" : ions fragmentaires : 427, 408, 404, 393, 391, 365, 352, 350, 317, 298, 285, 284, 283, 262, 219, 218, 204, 203, 197.
- substance "1,10" : ions fragmentaires : 427, 408, 393, 365, 352, 350, 315, 297, 286, 283, 281, 271, 262, 255, 218, 217, 206, 202, 196, 188.

En l'absence d'ions moléculaires, il ne nous a pas été possible d'identifier ces 2 substances.

- Le chromatogramme de la *sixième fraction* (15 % d'éther) présente également les pics des 4 phytostérols (sur OV-17 et sur Dexsil-300) en faible proportion, et en proportion légèrement plus importante 2 autres pics non identifiés, qui apparaissent aussi dans la fraction 5 (TR_{rel} sur OV-17 : 1,06 et 1,18).

La réaction de *Liebermann-Burchard*, donne lieu à une coloration bleue intense, qui au bout d'une heure vire au vert. Cette fraction est donc un mélange de Δ^5 et de Δ^7 ou de Δ^8 -stérols. Les Δ^5 -stérols sont très vraisemblablement le cholestérol, campestérol, stigmastérol et β -sitostérol ; les Δ^7 ou Δ^8 -stérols, qui se trouvent également dans la fraction 5 (cf. résultats de la CPG) peuvent être soit des déméthyl-4-stérols (cf. chap. III.1.1) soit des méthyl-4-stérols. Il serait nécessaire de poursuivre les investigations pour identifier ces produits.

- La *septième fraction* (20 % E/EP) ne contient apparemment que des déméthyl-4-stérols. Son chromatogramme présente 3 pics importants, correspondant au campestérol, stigmastérol et β -sitostérol et 1 pic plus petit correspondant au cholestérol. Un cinquième pic, légèrement plus important que celui du cholestérol, de $TR_{rel} = 1,10$ (sur OV-17), n'a pu être identifié.

La réaction de *Liebermann-Burchard* donne lieu à une coloration verte, ce qui confirmerait la présence de cholestérol, campestérol, stigmastérol et β -sitostérol.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé cette fraction par spectrométrie de masse et comparé les résultats avec les données de *Knights*¹⁷⁸ et avec celles du Mass Spectrometry Data Centre¹⁸⁴. Nous avons obtenu les résultats suivants :

- 1^{ère} substance ($TR_{rel.}$ sur Dexsil-300 : 0,71*)

l'ion moléculaire à m/e 458 et les ions fragmentaires principaux à m/e 207, 231, 247, 274, 275, 328, 329, 330, 353, 354, 368, 369, 443, 444 et 459 (figure 24) correspondent aux données de la littérature pour le triméthylsilyl'éther du cholestérol.

- 2^{ème} substance ($TR_{rel.}$ sur Dexsil-300 : 0,86*)

l'ion moléculaire à m/e 472 et les ions fragmentaires principaux à m/e 207, 228, 229, 233, 245, 255, 256, 259, 260, 261, 262, 273, 283, 288, 289, 290, 342, 343, 344, 354, 367, 368, 382, 383, 384, 472 et 473 (figure 25) correspondent aux données de la littérature pour le triméthylsilyl'éther du campestérol.

- 3^{ème} substance ($TR_{rel.}$ sur Dexsil-300 : 0,90*)

l'ion moléculaire à m/e 484 et les ions fragmentaires principaux à m/e 211, 213, 215, 228, 229, 231, 239, 253, 255, 256, 271, 273, 282, 283, 342, 343, 344, 351, 354, 355, 379, 394, 395, 396, 469, 470, 482 et 485 (figure 26) correspondent aux données de la littérature pour le triméthylsilyl'éther du stigmastérol.

* TR du β -sitostérol-TMS = 1

Figure 24
Spectre de masse du cholestérol - TMS

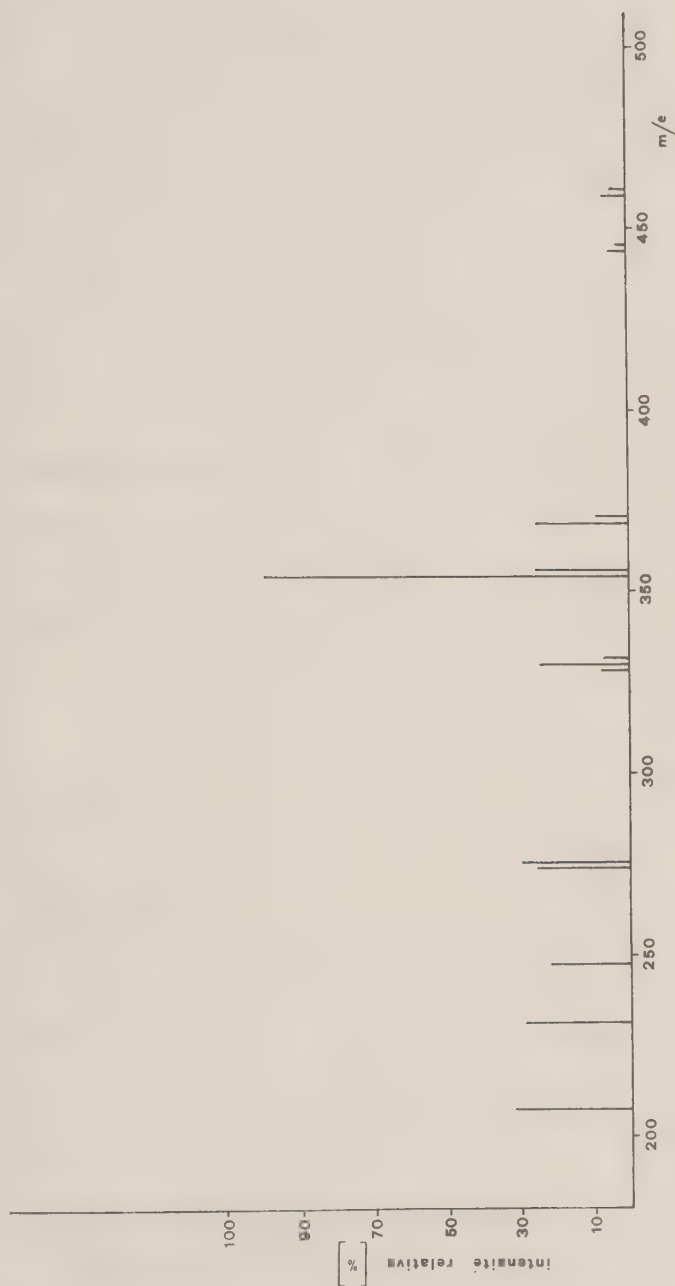


Figure 25
Spectre de masse du campesterol - TMS

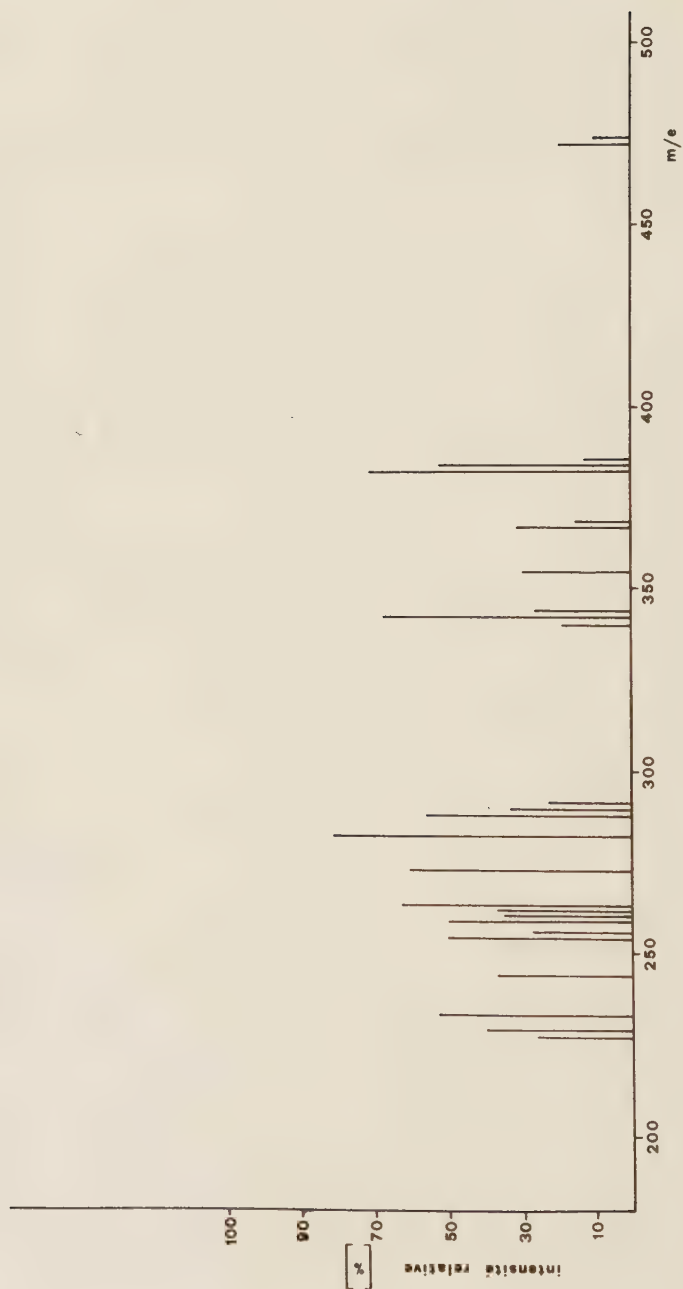


Figure 26
Spectre de masse du stigmastérol - TMS



Figure 27

Spectre de masse du β -sitostérol - TMS



- 4^{ème} substance (TR sur Dexsil-300 : 60,6 min) :

l'ion moléculaire à m/e 486 et les ions fragmentaires principaux m/e 185, 189, 196, 213, 215, 217, 255, 256, 259, 274, 275, 276, 302, 329, 356, 357, 358, 381, 382, 396, 397, 471, 487 et 488 (figure 27) correspondent aux données de la littérature pour le triméthylsilyléther du β -sitostérol.

- 5^{ème} substance (TR_{rel} sur Dexsil - 300 : 1,05)* n'a pas pu être identifiée par SM car elle se trouvait en quantité trop faible.

En résumé, on peut affirmer que les cals de *Digitalis purpurea* issus des 3 souches cultivées, contiennent du cholestérol, du campestérol, du stigmastérol et du β -sitostérol. De plus, ces cals contiennent d'autres Δ^5 stérols non identifiés (ceux-ci font selon toute évidence partie des déméthyl-4-stérols), ainsi que des Δ^7 ou Δ^8 stérols non identifiés (ces derniers pourraient appartenir aux déméthyl-4-stérols ou aux méthylstérols).

VI.3 Recherche des sapogénines et des dérivés du prégnane

VI.3.1 Matériel analysé

a) Nous avons recherché les sapogénines, la progestérone, la prégnénolone et la prégnanedione-3,20 par CPG dans le lot de cals qui a servi à l'identification des stérols (cf. chap. VI.2.1 A).

* TR du β -sitostérol-TMS = 1

- b) Nous avons extrait et analysé globalement un ensemble de cals provenant de différentes récoltes, afin de disposer au départ d'une quantité assez grande de tissus et obtenir ainsi les sapogénines en quantité suffisante pour entreprendre leur identification par d'autres méthodes.

Les caractéristiques de ces cals sont les suivantes :

souche : D.P.2

milieu de culture : SH

concentration de kinétine : 0/0,25/0,5/1,0 ppm

tissus prélevés pendant 12 mois, du 18ème au 30ème mois de la culture.

Les tissus ainsi prélevés ont été séchés 24 h à 50°, rassemblés et pulvérisés finement.

- c) Enfin, nous avons extrait un ensemble de cals provenant également de différentes récoltes afin de disposer de très grandes quantités d'extrait pour pouvoir mettre en évidence les dérivés du prégnane au moyen d'une autre méthode que la CPG.

Les caractéristiques de ces cals sont résumées ci-dessous :

souche : D.P.1

milieu de culture : SH

concentration de kinétine : 0/0,25/0,5/1,0 ppm

tissus prélevés pendant 12 mois, du 18ème au 30ème mois de la culture.

VI.3.2 Méthodes d'extraction

- a) Pour la première série de cals, nous avons procédé à l'extraction simultanée des stérols, sapogénines et autres stéroïdes selon la méthode décrite au chapitre VI.2.2 A.
- b) Pour le deuxième lot de cals, nous avons suivi la méthode décrite par Tomita et coll.⁷³ (extraction des sapogénines à partir des cultures de tissus de *Dioscorea tokoro*, en y apportant quelques modifications :

Mode opératoire

Réduire en poudre 20 g de tissus séchés et les introduire dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. Ajouter 170 ml de solution hydroéthanolique d'acide chlorhydrique (5 % d'HCl gaz dans de l'éthanol à 70 %) et chauffer le mélange à ébullition pendant 5 h. Ajouter 300 ml d'eau, refroidir et extraire par 2 portions de 100 ml puis par 3 portions de 50 ml d'acétate d'éthyle^{a)}. Réunir les extraits et les laver plusieurs fois avec de l'eau. Sécher les extraits avec du sulfate de sodium anhydre, puis les évaporer à env. 100 ml. Précipiter les sapogénines par adjonction d'éther^{a)}. Séparer le précipité du surnageant par centrifugation.

- c) Pour le troisième lot de cals, nous avons utilisé la même méthode d'extraction que pour le premier lot (description au chapitre VI.2.2 A) en adaptant les quantités de réactifs. Poids de tissus séchés et pulvérisés utilisé pour l'extraction : 70 g.

a) E. Merck, qualité "pour analyse".

VI.3.3 Méthodes d'identification

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre VI.2.3, la CPG à elle seule n'est pas une méthode suffisante pour l'identification des constituants d'un mélange. C'est pourquoi nous avons eu recours à la CCM pour confirmer les résultats de la CPG et mettre en évidence de façon sûre les sapogénines et les dérivés du prégnane.

VI.3.3.1 Chromatographie en phase gazeuse

Les extraits de la première série de cals (cf. chap. VI.2.1 A) ont été traités par le réactif de silylation et chromatographiés sur colonne d'OV-17 et de Dexsil-300, selon le procédé décrit au chapitre VI.2.3.1.

VI.3.3.2 Chromatographie sur couche mince

Les chromatogrammes en phase gazeuse présentent des pics correspondant aux sapogénines et à la progestérone, mais la concentration de ces composés est trop faible pour qu'ils puissent être saisis par spectrométrie de masse. D'autre part, l'utilisation d'autres méthodes d'identification, telles que le point de fusion¹⁸⁵ et le point de fusion mixte¹²⁴, la spectroscopie IR^{124,160}, la RMN¹⁸⁶ ou le pouvoir rotatoire¹⁶⁰, nécessite des substances hautement purifiées. Or, l'obtention de sapogénines très pures implique un grand nombre d'opérations

de séparation et de recristallisation^{59,124,160,180,185,187}, pour lesquelles il faut disposer de matériel de départ en grande quantité, ce qui n'était pas possible dans notre cas. De même, la très faible teneur en progestérone de nos extraits (cf chap. VII.4.7) ne nous a pas permis d'isoler cette substance.

Dans ces conditions, la CCM effectuée en parallèle avec des substances de référence, représente la meilleure méthode d'analyse avec la CPG.

A. Chromatographie sur couche mince des sapogénines

La CCM permet une excellente séparation des sapogénines présentes dans la Digitale pourpre. L'utilisation de dérivés (acétates ou trifluoroacétates) est fréquente, surtout pour la séparation des isomères^{160,188}, mais d'excellentes séparations de sapogénines libres ont également été obtenues, sur gel de silice G^{124,163,189} ou H¹⁸⁵, ou sur oxyde d'aluminium^{166,190}.

Après avoir essayé un grand nombre de systèmes chromatographiques pour la séparation de la gitogénine, digitogénine et tigogénine, de même que les réactifs cités dans la littérature pour la révélation des chromatogrammes (anisaldéhyde¹⁵⁸, chlorure d'antimoine-III en solution dans l'acide chlorhydrique^{191,192}, acide sulfurique à différentes concentrations^{193,194} et acide p-toluènesulfonique à 20 % dans l'éthanol absolu¹⁸⁵), nous avons retenu les conditions suivantes :

Phase stationnaire¹⁶² :

Gel de silice G^{a)} 0,25 mm, séché à température ordinaire et activé 1 h à 110°.

Phase mobile¹⁶³ :

Chloroforme^{b)}-acétone : 90 : 10

ou dichlorométhane-méthanol : 97 : 3.

Révélation¹⁸⁵ :

Vaporiser sur la chromatoplaque une solution à 20 % d'acide p-toluènesulfonique dans l'éthanol absolu ; chauffer quelques minutes à 110-130° ; observer à la lumière U.V.

Sapogénines de référence :

La tigogénine provenait de la Maison *Sigma* ; la digitogénine et la gitogénine nous ont été très aimablement offertes par le Professeur *T. Reichstein*.

La tigogénine contenait quelques impuretés et a été recristallisée dans du méthanol.

Toutes les sapogénines de référence ont été mises en solution dans le mélange chloroforme-méthanol (8 : 2).

Mode opératoire :

Les solutions de référence et les extraits (cf. chap. VI.3.1 b) dissous dans le mélange chloroforme-méthanol (8 : 2), sont déposés sur les chromatoplaques au moyen d'une

a) Gel de silice G (type 60) pour CCM, *E. Merck*.

b) Les solvants organiques et les réactifs sont de qualité "pour analyse" de *E. Merck*.

microseringue Hamilton (type 701 N).

La cuve est tapissée de papier filtre et saturée au préalable avec la phase mobile. La migration se fait jusqu'au haut de la plaque, soit sur 18 cm. Les plaques sont séchées à l'air, puis révélées.

B. Chromatographie sur couche mince de la progestérone

En 1962, Bennett et Heftmann¹⁹⁵ ont mis au point différents systèmes de CCM permettant de séparer les dérivés du prégnane. C'est un de ces systèmes que nous avons adopté, en utilisant toutefois d'autres réactifs¹⁹⁶, plus spécifiques, pour la révélation :

*Phase stationnaire*¹⁹⁵ :

Gel de silice G^{a)} 0,25 mm, séché à 25° pendant une nuit et développé une fois avec du chloroforme^{b)} avant l'emploi.

Phase mobile :

Chloroforme-méthanol-eau : 97:3:0,2.

Révélation :

Les chromatogrammes ont été révélés selon 2 méthodes différentes.

- a) Vaporiser successivement sur la première chromatoplaque les deux solutions ci-après :

a) Gel de silice G (type 60) pour CCM, E. Merck.

b) Les solvants organiques et les réactifs sont de qualité "pour analyse" de E. Merck.

- | | |
|--------------------------------|---------|
| 1. dinitro-2,4-phénylhydrazine | 1,0 g |
| acide chlorhydrique à 36 % | 10 ml |
| éthanol à 95 % | 1000 ml |

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| 2. hexacyanoferrate-III de potassium | 0,2 g |
| acide chlorhydrique 2 N | 100 ml |

Observer à la lumière du jour et à la lumière UV.

Ce réactif est spécifique du groupement carbonyle.

- b) Vaporiser sur la deuxième chromatoplaque le mélange des deux solutions :

- | | |
|---|-------|
| 1. bleu de tétrazolium, solution méthanolique à 0.5 % | 50 ml |
| 2. NaOH 6N | 50 ml |

Observer à la lumière du jour.

Ce réactif est spécifique des corticostéroïdes réducteurs et d'un certain nombre de substances réductrices.

Progestérone de référence :

Elle provient de la Maison *Calbiochem*.

Mode opératoire :

La solution de référence et l'extrait (cf. chap. VI.3.1 c) dissous dans le dichlorométhane, sont déposés

sur les chromatoplaques au moyen d'une microsiringue Hamilton (type 701 N). La migration se fait sur 15 cm. Les plaques sont séchées à l'air, puis révélées.

VI.3.4 Résultats

1) Les 24 extraits de cals de *Digitalis purpurea* (cf. chap.

VI.2.1 A) chromatographiés en phase gazeuse sur colonne d'OV-17 à 5%, en alternance avec des solutions de référence, donnent tous des pics correspondant à la tigogénine et à la gitogénine. Leurs temps de rétention relatifs (par rapport au β -sitostérol) coïncident parfaitement avec ceux des substances de référence (tableaux 11-13).

22 extraits présentent un pic dont le TR_{rel} correspond exactement à celui de la progestérone (tableaux 11-13). En outre, on observe dans tous les extraits la présence de plusieurs substances non identifiées dont seulement une ou deux, selon l'extrait, ont des TR_{rel} correspondant à ceux des stérols non identifiés (cf. chap. VI.2.4); deux d'entre elles apparaissent entre la tigogénine et la gitogénine, les autres après la gitogénine. Dans quelques extraits seulement, un de ces pics apparaît à un TR_{rel} se rapprochant de celui de la digitogénine. La prégnénolone et la prégnanediolone-3,20 semblent être absentes.

Quelques extraits de chaque souche, chromatographiés sur

colonne de Dexsil-300 à 1 %, ont donné des résultats tout à fait comparables (tableau 14).

D'autre part, l'adjonction de substances de référence (tigogénine, gitogénine et progestérone) à nos extraits et la superposition des pics qui en résulte (sur Dexsil-300), nous ont permis d'émettre l'hypothèse de travail que ces extraits contiennent la tigogénine, la gitogénine et la progestérone. La présence de digitogénine est incertaine ; quant à la digalogénine, elle n'a pas pu être recherchée faute de substance de référence.

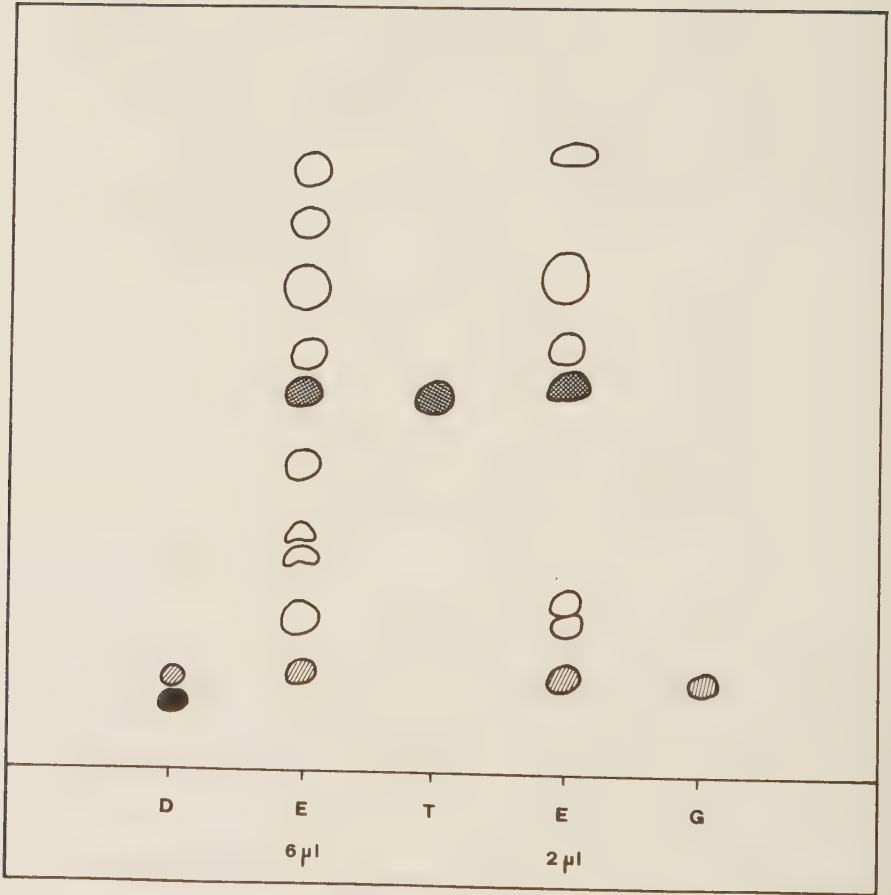
- 2) L'extrait descals de la souche D.P.2 (Ch. Chap. VI.3.1 b) a été analysé par CCM selon la méthode décrite plus haut, et a donné le résultat représenté par la figure 28. On peut observer sur ce chromatogramme, outre de nombreuses autres taches, 2 taches correspondant à la gitogénine ($R_f = 0,26$) et à la tigogénine ($R_f = 0,47$).
- 3) L'extrait des cals de la souche D.P.1 (Cf. chap. VI.3.1 c) a été analysé par CCM selon la méthode décrite plus haut, et a donné les résultats représentés par la figure 29 (a et b). On peut observer sur le premier chromatogramme, outre quelques taches non identifiées et visibles à la lumière UV, une tache correspondant à la progestérone par son R_f (0,87), sa couleur jaune à la lumière visible et sa forte absorption à la lumière UV. Sur le deuxième chromatogramme, on observe également une

tache correspondant à la progestérone, colorée en violet, comme le témoin.

En conclusion, nous pouvons affirmer que nos cultures de tissus sont capables de synthétiser de la tigogénine, de la gitogénine et de la progestérone en quantités mesurables. La présence de digitogénine n'a pas pu être prouvée ; la pré-gnéolone et la prégnanedione-3,20 sont absentes.

Figure 28

*Mise en évidence des sapogénines
dans un extrait de cals.*



● fluorescence jaune ● fluorescence bleu-vert ● fluorescence bleue

E = extrait des cals de la souche D.P.2

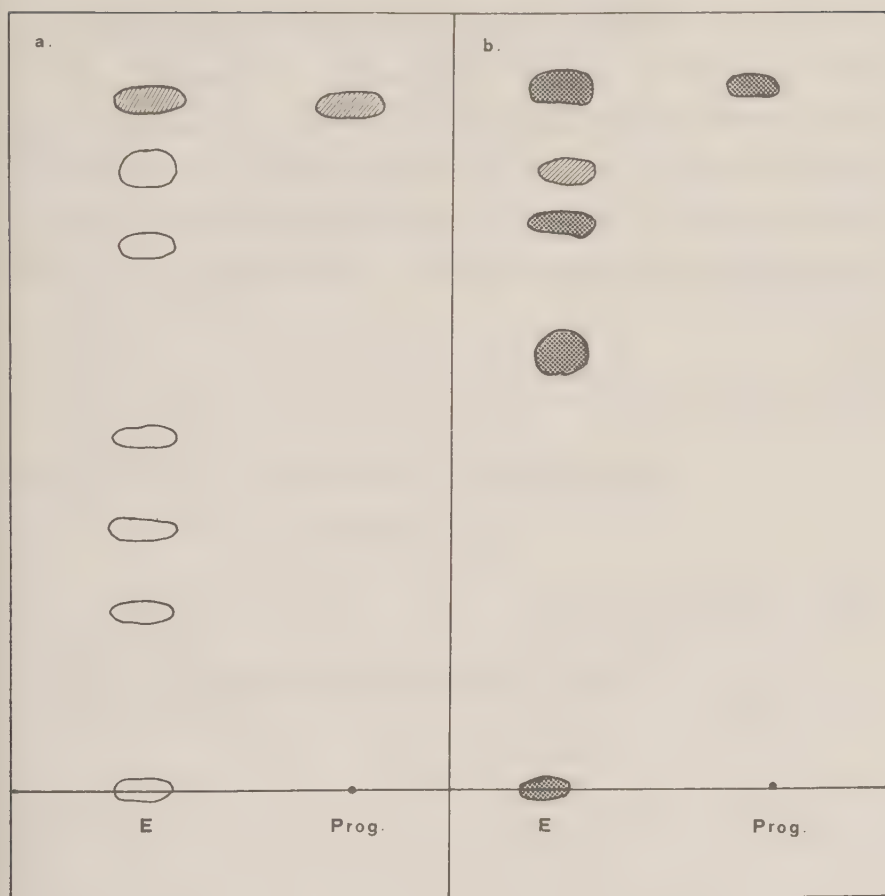
D = digitogénine

T = tigogénine

G = gitogénine

Figure 29

*Mise en évidence de la progestérone
dans un extrait de cals.*



 jaune à la lumière visible
  violet à la lumière visible
  visible à la lumière UV

E = extrait des cals de la souche D.P.1

VII Analyse quantitative

VII.1 But de l'expérience

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence pratiquement les mêmes stéroïdes dans tous les extraits analysés. Il nous a alors semblé intéressant de déterminer si la composition du milieu, la concentration en kinétine ou l'origine de la souche pouvait influencer quantitativement la biosynthèse de l'un ou l'autre des stéroïdes présents.

VII.2 Matériel utilisé

Les dosages ont été effectués sur les 24 extraits de cals utilisés pour l'analyse qualitative (cf. chap. VI.2.1 A).

VII.3 Méthode d'extraction

La méthode d'extraction a été décrite au chapitre VI.2.2.

VII.4 Méthode de dosage

VII.4.1 Choix de la méthode

Nous avons déjà vu au chapitre VI.2.3.1, que les méthodes usuelles de dosage des stérols ou des sapogénines ne permettent pas de saisir simultanément ces 2 classes de produits.

La constitution relativement complexe de nos extraits et la grande similitude de structure des substances à doser, nous ont orienté vers les méthodes chromatographiques.

La séparation et le dosage direct sur chromatoplaque¹⁴⁵ est d'usage limité pour le moment. En revanche, l'utilisation de la CPG a permis de doser avec succès aussi bien des stérols¹⁷³ que des sapogénines^{59,108,163} dans des mélanges contenant des représentants très proches sur le plan chimique, de l'une ou l'autre de ces classes de produits.

Grâce, principalement, à la méthode d'extraction que nous avons élaborée, il nous a été possible d'utiliser la CPG pour le dosage simultané des stérols, des sapogénines et des dérivés du prégnane.

Rappelons très brièvement le principe de dosage par CPG. Sur un chromatogramme, la surface d'un pic est liée à la quantité de l'éluat qu'il représente par la relation :

$$M_i = A_i \cdot K_i$$

où M_i = masse de substance i ayant traversé le détecteur
 A_i = surface du pic correspondant à l'éluat i
 K_i = facteur de proportionnalité dépendant de la réponse du détecteur au composé i , de l'amplification du signal et de la vitesse de déroulement de l'enregistreur.

L'analyse quantitative se ramène donc à une mesure de surface et à la détermination d'un facteur de réponse.

VII.4.2 Mesure de l'aire des pics

Il existe de nombreuses façons de mesurer l'aire des pics¹⁹⁷, dont voici les principales :

1. mesure de la hauteur des pics
2. triangulation (produit hauteur par largeur à mi-hauteur)
3. découpage et pesée des pics
4. planimétrie des pics
5. intégration électronique.

Nous avons choisi, pour des raisons pratiques, la mesure du produit de la hauteur par la largeur à mi-hauteur

pour les pics suffisamment grands et symétriques (campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, tigogénine et étalons internes). Pour les pics asymétriques ou très petits (cholestérol, progestérone et gitogénine), nous avons procédé par découpage et pesée des pics.

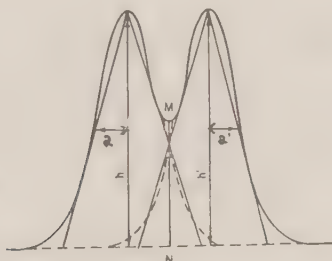
Méthodes utilisées

A. Produit hauteur par largeur à mi-hauteur

C'est la méthode manuelle la plus utilisée^{108,163} et elle donne d'excellents résultats pour des pics symétriques (précision : 2-3 %), ce qui est le cas pour notre séparation sur OV-17. La largeur du pic à mi-hauteur est préférée à la demi-largeur à la base à cause de la difficulté de la détermination de cette dernière valeur. L'utilisation d'une grande vitesse de déroulement du papier facilite les mesures.

Figure 30

Triangulation de pics partiellement superposés



Dans le cas où 2 pics se recouvrent partiellement comme le campestérol et le stigmastérol (figure 23), nous avons résolu le problème en multipliant la hauteur (h ou h' sur la figure 30) par la largeur à mi-hauteur, elle-même calculée à partir de la demi-largeur "extérieure" du pic (a et a' sur la figure 30).

Nous avons ramené toutes les surfaces calculées à des valeurs correspondant à l'atténuation de 160.

B. Découpage et pesée des pics

Le principal inconvénient de cette méthode est la durée de l'opération. L'exactitude est par contre satisfaisante. L'étude statistique¹⁹⁸ des données expérimentales a donné des limites de confiance $\pm 4,1 \%$ pour des très petits pics ($4,64 \text{ cm}^2$) et de $\pm 2,15 \%$ pour des pics plus grands ($36,2 \text{ cm}^2$), ($P = 0,05$). Il est évident d'autre part que l'exactitude et la reproductibilité des mesures dépendent de l'habileté de l'opérateur pour le découpage.

Nous avons procédé comme suit :

Les chromatogrammes sont photocopiés. Le recours aux photocopies assure une plus grande régularité dans le poids du papier et évite la destruction des chromatogrammes. Les photocopies sont découpées, puis conservées pendant 24 heures dans la salle des balances et à l'abri de la

poussière, avant la pesée. Au cours de toutes les opérations, on évite soigneusement tout contact des photopies avec les doigts.

Lorsque 2 pics se superposent partiellement (cholestérol et progestérone), nous les séparons par une ligne perpendiculaire à l'axe des abscisses (NM sur la figure 30). Cette méthode est d'ailleurs celle qui est utilisée par les intégrateurs électroniques.

Les poids obtenus (en g) ont été ramenés à des valeurs correspondant à une atténuation de 160. Afin de comparer ces valeurs avec celles obtenues par mesure de la surface (en mm^2), nous les avons multipliées par un facteur de 10109^* pour les transformer également en mm^2 .

VII.4.3 Facteurs de proportionnalité

Le facteur de proportionnalité est un coefficient qui dépend à la fois de l'opération d'injection, du comportement de la phase stationnaire, de la réaction du détecteur, du fonctionnement de l'amplificateur et de la réponse de l'enregistreur. Il est impossible d'établir par le calcul la valeur de ce coefficient; il devient donc indispensable de tracer dans des conditions strictement reproductibles et en utilisant simultanément des étalons internes appropriés, une courbe d'étalonnage pour

* Calcul de ce facteur : la surface en mm^2 d'une photocopie format A4 est divisée par le poids moyen d'une feuille, exprimé en g : $62265/6,1594$.

chaque soluté. La pente de cette courbe n'est autre que le facteur de proportionnalité recherché.

VII.4.4 Etalons internes

L'étalonnage interne est la meilleure méthode pour obtenir des résultats précis et reproductibles. Dans l'étalonnage interne, une quantité connue d'un ou de plusieurs étalons, non présents dans le mélange initial, est ajoutée à l'échantillon. Son rôle consiste à fournir des indications précises quant à la quantité de soluté injectée dans le chromatographe. Il dispense ainsi l'opérateur de mesurer avec grande précision le volume injecté. Simultanément, le pic fourni par cet étalon constitue un indice du bon fonctionnement du détecteur.

Le recours à plusieurs étalons internes augmente la précision des résultats.

Le choix des étalons doit répondre aux critères principaux suivants :

- être d'une grande pureté
- être soluble dans le mélange à analyser
- être chimiquement inerte envers les constituants du mélange et envers la phase stationnaire
- avoir un temps de rétention pas trop éloigné de ceux des composés à analyser
- ne pas se superposer à un autre pic du chromatogramme.

Parmi les nombreuses substances que nous avons étudiées à cet effet, l'oestrone (ou l'oestratriène-1,3,5-01-3-one-17) et l'hécogénine nous ont paru comme étant les plus adaptées à cet usage.

L'oestrone a un TR inférieur à celui du cholestérol, tandis que l'hécogénine est éluee en fin de chromatogramme.

Nous avons vérifié par CPG la pureté de ces 2 produits ; l'oestrone (qualité USP)^{a)} était très pure, alors que l'hécogénine^{b)} contenait plusieurs impuretés en faible quantité. Nous l'avons donc recristallisée à 2 reprises dans de l'acétone et avons obtenu un produit cristallin, sous forme de longues aiguilles blanches.

Nous avons utilisé pour nos dosages une solution (E) d'oestrone (de l'ordre de 0,3 %) et d'hécogénine (de l'ordre de 0,5 %) dans la pyridine anhydre^{c)}.

Cette solution a servi à la fois de solvant pour les extraits, de catalyseur de la réaction de silylation (grâce à la pyridine) et d'étalon interne.

Un volume exactement mesuré (800 µl) a été ajouté à chaque extrait.

La courbe d'étalonnage de ces 2 étalons a été établie en même temps que celle des substances de référence (cf. chap. VII.4.5).

a) Fluka AG, Buchs.

b) Sigma Chemical Company.

c) E. Merck, qualité "pour analyse", purifiée selon la méthode décrite au chapitre VI.2.3.1.

VII.4.5 Substances de référence-courbes d'étalonnage

Comme nous l'avons vu auparavant (chap. VI), les constituants importants de nos extraits sont les suivants : progestérone, cholestérol, campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, tigogénine et gitogénine.

Nous avons pu nous procurer des produits de plus ou moins grande pureté, dont nous avons déterminé la teneur par CPG. Les valeurs qui suivent sont celles des produits tels que nous les avons utilisés. Parmi ceux-ci, seule la tigogénine avait été recristallisée dans du méthanol.

cholestérol ^{a)}	: 98,7 %
campestérol ^{b)}	: 98,2 %
β -sitostérol ^{c)}	: 98,3 %
stigmastérol ^{d)}	: 94,4 %
progestérone ^{e)}	: 72,3 %
gitogénine ^{f)}	: 82,4 %
tigogénine ^{d)}	: 96,3 %.

Ces facteurs ont été introduits dans nos calculs lors de l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Pour établir cette courbe, nous avons préparé une solution étalon silylée contenant les 7 substances de référence et les 2 étalons internes en quantités exactement connues. Puis

a) Sigma Chemical Company, qualité : "standard pour chromatographie", Sigma grade.

b) Serva, Heidelberg, qualité "pour analyse" : $\geq 99\%$.

c) Serva, Heidelberg, qualité "puriss" : $\geq 95\%$.

d) Sigma Chemical Company.

e) Calbiochem, qualité "A grade".

f) Aimablement offerte par le Professeur T. Reichstein de l'Université de Bâle.

*Courbes d'étalonnage
(paramètres des droites de régression)*

	b	a	s_b	$s_{y \cdot x}^2$	r
1 oestrone	1,2480	-1,7364	0,0250	0,4063	0,9940
2 hécogénine	0,7998	-2,3861	0,0105	0,09399	0,9976
3 campestérol	1,5391	-0,9794	0,0408	0,1604	0,9951
4 cholestérol	1,8594	-0,0883	0,0225	0,0003735	0,9990
5 gitogénine	1,4626	-0,0031	0,1853	0,04517	0,9036
6 progestérone	0,7680	-0,0733	0,0366	0,001694	0,9844
7 β -sitostérol	1,3663	-2,1380	0,0131	0,08281	0,9994
8 stigmastérol	1,1893	-0,2596	0,0431	0,1598	0,9909
9 tigogénine	1,0984	-0,4660	0,0139	0,009375	0,9989

1-2 = étalons internes

3-9 = substances à doser

 $y = bx + a$ y = surface du pic (mm^2) / 1000 x = μg de substance s_b = écart-type de la pente $s_{y \cdot x}^2$ = variance de y après élimination de l'influence de la dispersion de x r = coefficient de corrélation

nous avons chromatographié des quantités variables de cette solution allant de 0,45 à 7,65 μ l. A l'aide des 16 chromatogrammes obtenus, nous avons calculé les droites de régression pour chaque substance.

- Droites de régression : voir tableau 15.

VII.4.6 Analyse quantitative des extraits

L'analyse quantitative a été réalisée sur colonne d'OV-17 à 5 %, dans les conditions décrites au chapitre VI.2.3.1. A la totalité de chaque extrait (env. 200 mg), on ajoute le réactif de silylation en quantité exactement mesurée (1,60 ml) (cf. chap. VI.2.3.1) et la solution E, également en quantité exactement mesurée (800 μ l). Après agitation et chauffage, on laisse décanter. On chromatographie environ 6 μ l de la phase supérieure limpide, en répétant cette opération 3 fois au minimum.

L'atténuation de l'appareil est modifiée en cours de chromatographie, en fonction de chaque pic analysé, mais de façon identique pour toutes les analyses. La vitesse de déroulement du papier est de 20 mm/min. La surface des pics est déterminée selon la méthode décrite plus haut.

VII.4.7 Traitement des données et résultats

Nous avons suivi pour le calcul des résultats la

méthode décrite ci-dessous :

Considérons 3 chromatogrammes d'un extrait à analyser, obtenu à partir de p g de tissu végétal sec et mélangé, avant l'analyse, avec e g d'oestrone et h g d'hécogénine. Si nous appelons i le numéro du chromatogramme, $Y_{1i}, Y_{2i}, Y_{3i} \dots Y_{7i}$ les surfaces des pics correspondant aux 7 substances à doser et Y_{ei}, Y_{hi} les surfaces des pics dus à l'oestrone et à l'hécogénine, nous aurons pour un groupe de 3 chromatogrammes les valeurs suivantes :

chromatogr. N° 1 : $Y_{11}, Y_{21}, Y_{31} \dots, Y_{71}, Y_{e1}, Y_{h1}$

chromatogr. N° 2 : $Y_{12}, Y_{22}, Y_{32} \dots, Y_{72}, Y_{e2}, Y_{h2}$

chromatogr. N° 3 : $Y_{13}, Y_{23}, Y_{33} \dots, Y_{73}, Y_{e3}, Y_{h3}$

Soit $Y_{1m}, Y_{2m}, Y_{3m} \dots Y_{7m}, Y_{em}$ et Y_{hm} les valeurs moyennes des surfaces des pics calculées à partir des données des 3 chromatogrammes selon le principe : $(Y_{11} + Y_{12} + Y_{13})/3 = Y_{1m}$.

A l'aide des droites de régression préalablement établies, nous pouvons calculer les quantités moyennes de substances à doser (X_m) et d'étalons internes (X_{em}, X_{hm}) correspondant à ces pics. En effet, $(Y_{1m} - a_1)/b_1 = X_{1m}$, où b_1 = la pente et a_1 = le paramètre de la régression établie pour la substance 1.

La quantité de tissu sec correspondant à l'extrait injecté au chromatographe, est donnée par $E_e = p.X_{em}/e$ si on prend comme base les résultats obtenus pour l'oestrone et par $E_h = p.X_{hm}/h$ si on calcule d'après les résultats de l'hécogénine.

E_e n'étant pratiquement jamais égal à E_h , nous utilisons la moyenne des 2 valeurs pour la suite du calcul : $E_m = (E_e + E_h)/2$.

Les concentrations moyennes des substances dosées dans le tissu sec, sont données par $C_{1m} = X_{1m}/E_m$. Ces valeurs, divisées par le poids moléculaire de la substance concernée, sont transformées en moles/l g de tissu sec.

Les limites de tolérance (X_T) des concentrations C sont calculées selon la formule :

$$X_T = X_m + \frac{b(Y_m - \bar{y}) \pm \sqrt{F_{0,05} \cdot s^2 [D(1/M + 1) + (Y_m - \bar{y})^2 / S_x]}}{D}$$

où $D = b^2 - s^2 \cdot F_{0,05} / S_x$ et $X_m = (Y_m - a)/b$

Y_m = la surface du pic (moyenne de 3 chromatogrammes)

X_m = la quantité de substance qui y correspond

M = le nombre de chromatogrammes ayant servi au dosage de la substance (généralement 3 dans notre cas)

Les autres valeurs figurant dans cette formule, sont calculées lors de l'établissement de la droite de régression, à savoir :

b = la pente et a = le paramètre de la régression

$\bar{y}$ = la moyenne des surfaces des pics utilisées pour le calcul de la droite de régression

$F_{0,05}$ = la valeur de la fonction de *Fieller* pour

$P = 0,05$, $v_1 = 1$ et $v_2 = N-2$

s^2 = la variance de y après élimination de l'influence de la dispersion de x

S_x = l'écart quadratique de x autour de $\bar{x}$ (moyenne des quantités de substance utilisées pour l'établissement de la droite de régression)

N = le nombre de chromatogrammes ayant servi à l'établissement de la régression.

Les calculs ont été effectués au Centre Universitaire d'Informatique, à l'aide de l'ordinateur Univac 1108.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 16 à 39 et dans les figures 31 à 39.

Les valeurs numériques des tableaux sont une copie des résultats fournis par l'ordinateur. Nous reproduisons ceux-ci tels quels pour des raisons pratiques, mais nous tenons à souligner que seuls les 3 premiers chiffres sont significatifs.

Rappelons que cette manière de calculer les résultats permet de voir immédiatement s'il y a une différence significative entre les concentrations d'une substance dans 2 tissus d'origine différente. En effet, il n'y a de différence significative entre 2 valeurs que lorsque leurs limites de tolérance ne se chevauchent pas.

VII.4.8 Conclusions

L'étude quantitative des métabolites secondaires dérivés du stérane met en évidence 2 faits saillants :

- 1) le β -sitostérol est le métabolite principal. Il représente invariablement le 40-60 % du total des stéroïdes accumulés dans les tissus. Sa concentration oscille entre 300 et 800 nmoles/l g de tissu sec, alors que, à une exception près, les concentrations des autres métabolites dosés ne dépassent jamais la valeur de 200 nmoles/l g de tissu sec.
- 2) Il est impossible d'établir des règles empiriques exprimant les variations de la concentration des métabolites dans les tissus en fonction de la nature du milieu nutritif ou de sa teneur en kinétine. Les 3 souches étudiées réagissent de manière irrégulière et non comparable d'un cas à l'autre.

De plus, les variations que laisseraient entrevoir les figures 38 et 39 ne concernent que les valeurs moyennes du dosage. Les limites de tolérance (voir fig. 31-37), que nous donne le calcul statistique, réduisent de manière appréciable le nombre des cas pour lesquels on peut admettre qu'il y a une variation significative de la concentration d'un métabolite en fonction d'un facteur donné.

Il est intéressant de constater que, dans le meilleur des cas, nous avons obtenu un rendement de :

1254 nmoles de stérols totaux/1 g de tissu sec, soit
520 µg/1 g de tissu sec (exprimé en β-sitostérol)
(D.P.2 sur MS, sans kinétine)

201 nmoles de sapogénines totales/1 g de tissu sec, soit
83,8 µg/1 g de tissu sec (exprimé en tigogénine)
(D.P.2 sur MS, sans kinétine)

78,4 nmoles de progestérone/1 g de tissu sec, soit
24,6 µg/1 g de tissu sec
(D.P.2 sur SH, sans kinétine).

Selon Evans^{199,200}, les tissus de la plante entière de *Digitalis purpurea* contiennent :

environ 100 µg de stérols totaux/1 g de tissu frais, la première année

environ 77 µg de stérols totaux/1 g de tissu frais la deuxième année

environ 418 µg de sapogénines totales/1 g de tissu frais à la fin de la première année

et environ 3767 µg de sapogénines totales/1 g de tissu sec de fruit au moment de la maturation.

Tableau 16

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec			
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
cholestérol	8,27	21,39	20,15	22,61	2,02
campestérol	39,93	99,66	65,16	132,04	9,41
stigmastérol	82,45	199,79	160,67	236,59	18,87
β-sitostérol	237,34	572,34	550,12	594,30	54,05
tigogénine	42,36	101,67	91,13	111,92	9,60
gitogénine	4,77	11,04	-9,85	26,36	1,04
progestérone	16,66	53,00	45,52	60,29	5,00

Tableau 17

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance /1 mole de cholestérol	
cholestérol	6,89	17,81	16,55	19,05		1,53
campestérol	42,58	106,29	72,44	138,09	5,97	9,13
stigmastérol	85,25	206,58	168,21	242,76	11,60	17,74
β-sitostérol	257,77	621,59	599,81	643,15	34,89	53,39
tigogénine	51,12	122,70	112,58	132,56	6,89	10,54
gitogénine	7,53	17,40	-1,73	32,07	0,98	1,49
progestérone	22,60	71,88	64,67	79,32	4,03	6,17

Tableau 18

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec			
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
cholestérol	7,21	18,65	16,92	20,34	2,07
campestérol	42,87	107,00	61,07	150,01	11,90
stigmastérol	65,30	158,23	102,78	209,38	17,60
β-sitostérol	190,96	460,49	429,67	490,73	51,22
tigogénine	44,40	106,58	92,42	120,32	11,85
gitogénine	*	*			
progestérone	15,14	48,13	37,62	57,95	5,35

* = traces non mesurables

Tableau 19

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 1 ppm

	μg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec			
		Valeur moyenne	Limites de tolérance $p = 0,05$ inf. sup.	Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
cholestérol	7,23	18,71	17,57	19,82	1,73
campestérol	42,16	105,22	73,84	134,54	9,75
stigmastérol	76,01	184,18	148,45	217,46	17,06
β -sitostérol	251,15	605,63	586,16	624,87	56,10
tigogénine	40,28	96,69	87,06	106,02	8,96
gitogénine	5,21	12,05	-6,99	25,77	1,12
progestérone	17,92	56,98	50,48	63,39	5,28

Tableau 20

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : SH concentration en kinéline : 0 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne,	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
cholestérol	7,28	18,83	17,56	20,07		2,86
campestérol	39,03	97,41	62,94	129,75	5,17	14,78
stigmastérol	40,99	99,33	56,03	139,10	5,28	15,07
β-sitostérol	139,17	335,60	311,97	358,78	17,83	50,91
tigogénine	31,39	75,35	64,46	85,91	4,00	11,43
gitogénine	*	*				
progestérone	10,30	32,74	24,54	40,33	1,74	4,97

* = traces non mesurables

Tableau 21

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec			Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf.	sup.		
cholestérol	9,61	24,85	23,66	26,01		3,76
campestérol	34,83	86,94	52,72	119,01	3,50	13,17
stigmastérol	52,34	126,83	85,60	164,94	5,10	19,21
β-sitostérol	129,19	311,54	288,14	334,48	12,54	47,18
tigogénine	43,23	103,77	93,49	113,77	4,18	15,71
gitogénine	2,79	6,46	-15,14	21,89	0,26	0,98
progestérone	0,00	0,00				

Tableau 22

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche D.P.1 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles de substance /1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf.	sup.			
cholestérol	13,60	35,19	33,99	36,37			3,47
campestérol	53,57	133,72	97,86	167,28		3,80	13,19
stigmastérol	68,31	165,54	122,08	205,57		4,70	16,33
β-sitostérol	199,24	480,45	456,67	503,79		13,65	47,41
tigogénine	64,13	153,93	143,40	164,17		4,37	15,19
gitogénine	9,75	22,54	2,59	37,70		0,64	2,22
progestérone	6,95	22,11	12,60	30,59		0,63	2,18

Tableau 23

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.1 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 1 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec			Moles de substance /1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf.	sup.		
cholestérol	10,71	27,70	26,51	28,87		3,26
campestérol	46,35	115,69	81,96	147,43	4,18	13,62
stigmastérol	72,21	174,99	135,18	212,19	6,32	20,59
β-sitostérol	148,00	356,88	333,50	379,83	12,89	42,00
tigogénine	53,29	127,92	117,80	137,79	4,62	15,06
gitogénine	5,05	11,67	-8,93	26,84	0,42	1,37
progestérone	10,95	34,82	26,75	42,33	1,26	4,10

Tableau 24

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0 ppm

	µg de substance / 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
cholestérol	21,40	55,35	53,97	56,73		3,68
campestérol	50,96	127,20	87,00	164,97	2,30	8,46
stigmastérol	121,24	293,79	249,77	335,80	5,31	19,55
β-sitostérol	322,69	778,14	752,38	803,70	14,06	51,78
tigogénine	65,90	158,19	146,31	169,77	2,86	10,53
gitogénine	18,75	43,34	24,67	60,31	0,78	2,88
progestérone	14,74	46,87	37,58	55,61	0,85	3,12

Tableau 25

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance 1/mole de cholestérol		
cholestérol	16,49	42,65	41,53 43,77		3,67	
campestérol	48,75	121,68	89,28 152,20	2,85	10,48	
stigmastérol	48,71	118,03	77,19 155,71	2,77	10,17	
β-sitostérol	270,15	651,46	630,35 672,41	15,27	56,12	
tigogénine	60,15	144,38	134,80 153,73	3,39	12,44	
gitogénine	14,28	33,01	17,33 46,87	0,77	2,84	
progestérone	15,59	49,59	42,34 56,63	1,16	4,27	

Tableau 26

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
cholestérol	16,94	43,82	42,74	44,91		4,04
campestérol	45,99	114,78	83,67	144,09	2,62	10,59
stigmastérol	35,71	86,54	46,13	123,61	1,97	7,99
β-sitostérol	268,22	646,79	626,61	666,85	14,76	59,70
tigogénine	41,17	98,82	89,14	108,22	2,26	9,12
gitogénine	12,71	29,38	14,01	42,65	0,67	2,71
progestérone	19,92	63,34	56,60	70,20	1,45	5,85

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 1 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf.	sup.	Moles de substance /1 mole de cholestérol	
cholestérol	11,81	30,55	29,49	31,60		3,67
campestérol	47,35	118,18	86,49	147,83	3,87	14,21
stigmastérol	30,32	73,47	31,34	111,69	2,41	8,84
β-sitostérol	176,79	426,32	405,32	446,94	13,96	51,27
tigogénine	42,46	101,92	92,13	111,42	3,34	12,26
gitogénine	9,18	21,22	3,89	34,53	0,69	2,55
progestérone	18,82	59,84	53,22	66,40	1,96	7,20

Tableau 28

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
			inf.	sup.		
cholestérol	9,68	25,03	23,78	26,27		3,31
campestérol	50,89	127,02	92,34	159,68	5,07	16,78
stigmastérol	30,82	74,68	28,57	116,79	2,98	9,86
β-sitostérol	146,66	353,66	329,32	377,54	14,13	46,71
tigogénine	32,43	77,84	66,60	88,75	3,11	10,28
gítogénine	8,86	20,49	1,08	35,61	0,82	2,71
progestérone	24,65	78,38	70,84	86,22	3,13	10,35

Tableau 29

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance /1 mole de cholestérol		
cholestérol	14,37	37,16	36,03	38,30	3,98	
campestérol	49,34	123,15	90,00	154,37	3,31	
stigmastérol	42,76	103,61	61,08	142,71	2,79	
β-sitostérol	204,27	492,57	470,33	514,50	13,25	
tigogénine	45,14	108,36	98,08	118,35	2,92	
gitogénine	10,98	25,38	7,97	39,62	0,68	
progestérone	13,68	43,52	35,89	50,78	1,17	
					4,66	

Tableau 30

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec			
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance /1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
cholestérol	13,40	34,66	33,58	35,74	3,49
campestérol	54,39	135,74	104,72	165,05	13,66
stigmastérol	38,21	92,59	51,72	130,11	9,32
β-sitostérol	215,31	519,20	498,24	539,91	52,25
tigogénine	52,37	125,71	116,20	134,98	12,65
gítogénine	12,59	29,11	13,36	42,61	2,93
progestérone	17,81	56,63	49,73	63,50	5,70

Tableau 31

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.2 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 1 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec *				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf.	sup.	Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
cholestérol	15,78	40,80	39,68	41,93		3,70
campestérol	64,08	159,94	128,44	189,78	3,92	14,52
stigmastérol	44,97	108,96	67,32	147,31	2,67	9,89
β-sitostérol	237,66	573,10	551,56	594,41	14,05	52,02
tigogénine	53,37	128,10	118,24	137,71	3,14	11,63
gitogénine	13,66	31,58	15,51	45,54	0,77	2,87
progestérone	18,65	59,32	52,19	66,43	1,45	5,38

Tableau 32

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec			Moles de substance /1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.			
cholestérol	7,20	18,61	17,35	19,85		2,18
campestérol	40,21	100,37	66,17	132,48	5,39	11,74
stigmastérol	46,10	111,72	69,22	150,86	6,00	13,07
β-sitostérol	183,67	442,90	420,18	465,27	23,80	51,80
tigogénine	57,06	136,97	126,98	146,72	7,36	16,02
gitogénine	7,09	16,39	-3,06	31,19	0,88	1,92
progesterone	8,84	28,13	19,72	35,83	1,51	3,29

Tableau 33

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
cholestérol	6,98	18,05	16,80	19,27		1,65
campestérol	43,40	108,32	74,94	139,69	6,00	9,91
stigmastérol	70,92	171,86	132,68	208,47	9,52	15,72
β-sitostérol	238,18	574,37	552,69	595,81	31,82	52,54
tigogénine	63,05	151,33	141,68	160,78	8,38	13,84
gitogénine	11,53	26,65	9,64	40,75	1,48	2,44
progestérone	13,40	42,61	35,01	49,82	2,36	3,90

Tableau 34

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : MS concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.		Moles de substance /1 mole de cholestérol	
cholestérol	6,81	17,62	16,40	18,81		1,75
campestérol	39,86	99,50	66,75	130,26	5,65	9,89
stigmastérol	45,70	110,74	70,07	148,22	6,29	11,01
β-sitostérol	229,66	553,80	532,64	574,73	31,44	55,06
tigogénine	69,36	166,48	157,26	175,52	9,45	16,55
gitogénine	10,42	24,08	7,13	37,87	1,37	2,39
progestérone	10,56	33,57	25,83	40,77	1,91	3,34

Tableau 35

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 Milieu de culture : MS concentration en kinétine : 1 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05		Moles de substance /1 mole de cholestérol	
			inf.	sup.		
cholestérol	9,96	25,76	24,48	27,02		2,39
campestérol	48,81	121,83	86,14	155,41	4,73	11,29
stigmastérol	52,68	127,67	83,09	168,80	4,96	11,83
β-sitostérol	255,44	615,97	592,66	639,02	23,91	57,10
tigogénine	62,51	150,04	139,52	160,32	5,83	13,91
gitogénine	16,25	37,56	20,68	52,71	1,46	3,48
progestérone	*	*				

* = traces non mesurables

Tableau 36

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05		Moles de substance / 1 mole de cholestérol	
			inf.	sup.		
cholestérol	18,74	48,46	47,32	49,62		6,73
campestérol	35,95	89,73	56,08	121,29	1,85	12,47
stigmastérol	36,40	88,20	45,72	127,14	1,82	12,26
β-sitostérol	150,23	362,28	339,61	384,54	7,48	50,34
tigogénine	47,58	114,21	104,21	123,94	2,36	15,87
gitogénine	7,26	16,79	-2,02	31,17	0,35	2,33
progestérone	0,00	0,00				

Tableau 37

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,25 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec			Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05	inf. sup.		
cholestérol	4,48	11,58	9,90	13,22		1,53
campestérol	36,85	91,98	49,60	131,98	7,94	12,13
stigmastérol	27,56	66,78	12,18	117,08	5,77	8,81
β-sitostérol	175,81	423,96	394,77	452,72	36,62	55,92
tigogénine	44,55	106,94	93,95	119,61	9,24	14,11
gitogénine	10,96	25,34	3,08	43,77	2,19	3,34
progestérone	9,93	31,57	21,16	41,24	2,73	4,16

Tableau 38

TENEUR DES TISSUS EN STEROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 0,5 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance / 1 g de tissu sec				Moles de substance / 1 mole de cholestérol	Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05		sup.		
			inf.				
cholestérol	8,81	22,78	21,62		23,91		2,62
campestérol	44,84	111,91	79,93		142,01	4,91	12,86
stigmastérol	76,34	184,98	147,89		219,84	8,12	21,26
β-sitostérol	160,38	386,74	364,87		408,23	16,98	44,44
tigogénine	44,96	107,91	98,12		117,44	4,74	12,40
gitogénine	15,01	34,70	19,67		48,33	1,52	3,99
progestérone	6,68	21,23	12,91		28,76	0,93	2,44

Tableau 39

TENEUR DES TISSUS EN STÉROÏDES

Souche : D.P.3 milieu de culture : SH concentration en kinétine : 1 ppm

	µg de substance/ 1 g de tissu sec	nmoles de substance /1 g de tissu sec				Moles en % du total des stéroïdes dosés
		Valeur moyenne	Limites de tolérance p = 0,05 inf. sup.	Moles de substance /1 mole de cholestérol		
cholestérol	8,85	22,89	21,70 24,06		2,49	
campestérol	47,69	119,02	86,25 149,88	5,20	12,94	
stigmastérol	62,32	151,02	111,29 187,96	6,60	16,42	
β-sitostérol	185,04	446,21	424,04 468,03	19,50	48,52	
tigogénine	47,69	114,46	104,44 124,23	5,00	12,45	
gitogénine	19,40	44,84	30,35 59,36	1,96	4,88	
progestérone	6,67	21,20	12,60 28,97	0,93	2,31	

Figure 31
Teneur des tissus en cholestérol
(avec limites de tolérance)

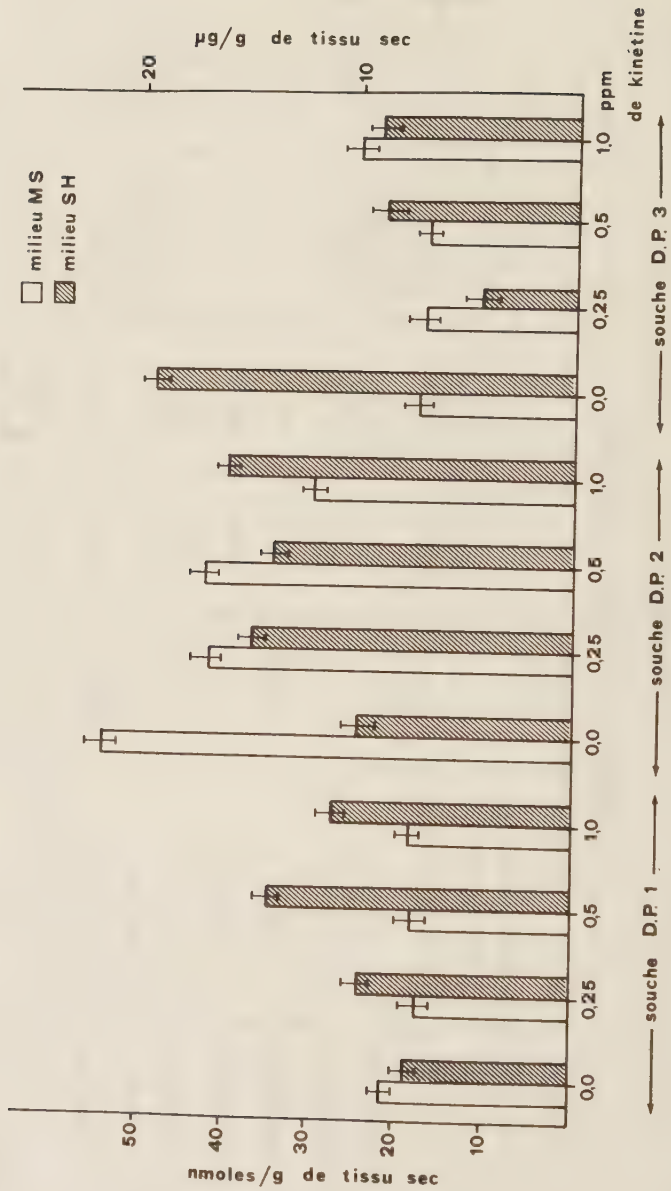


Figure 32

*Teneur des tissus en progestérone
(avec limites de tolérance)*

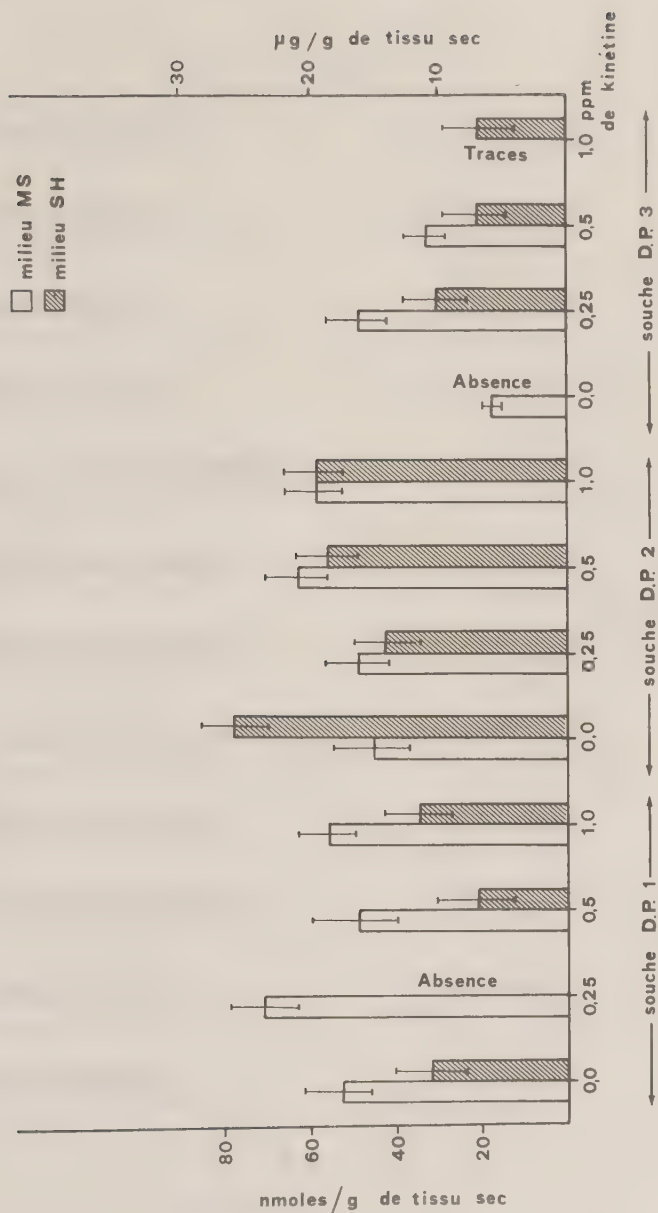


Figure 33
Teneur des tissus en campestérol
(avec limites de tolérance)

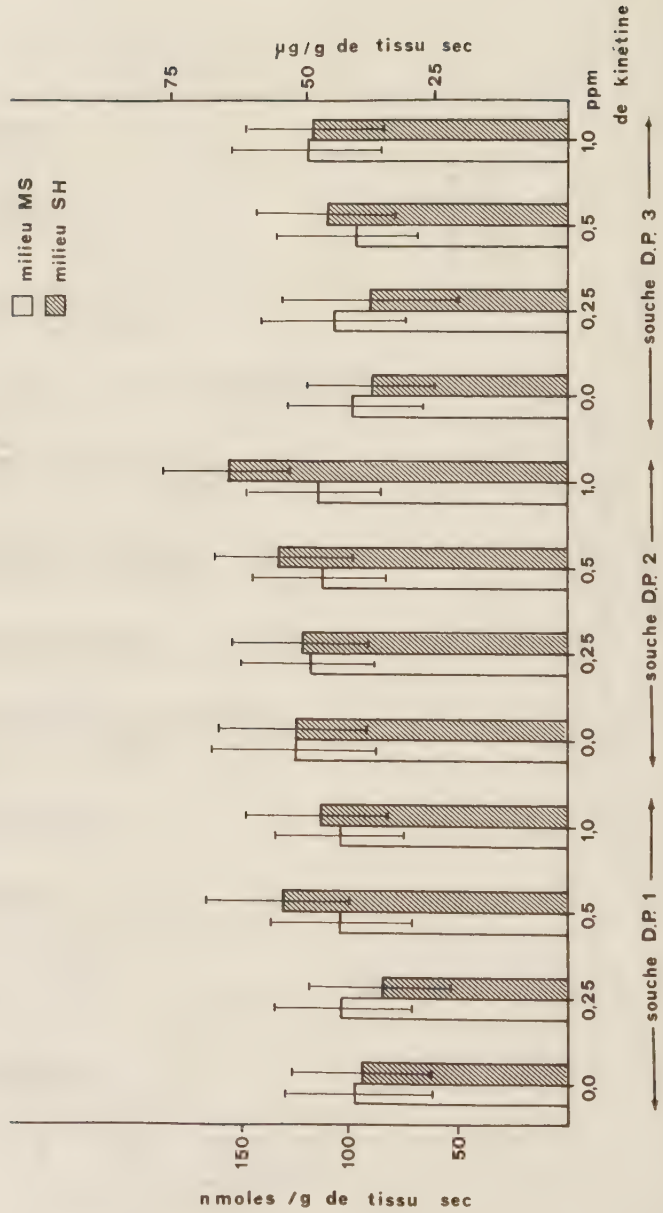


Figure 34

*Teneur des tissus en stigmastérol
(avec limites de tolérance)*

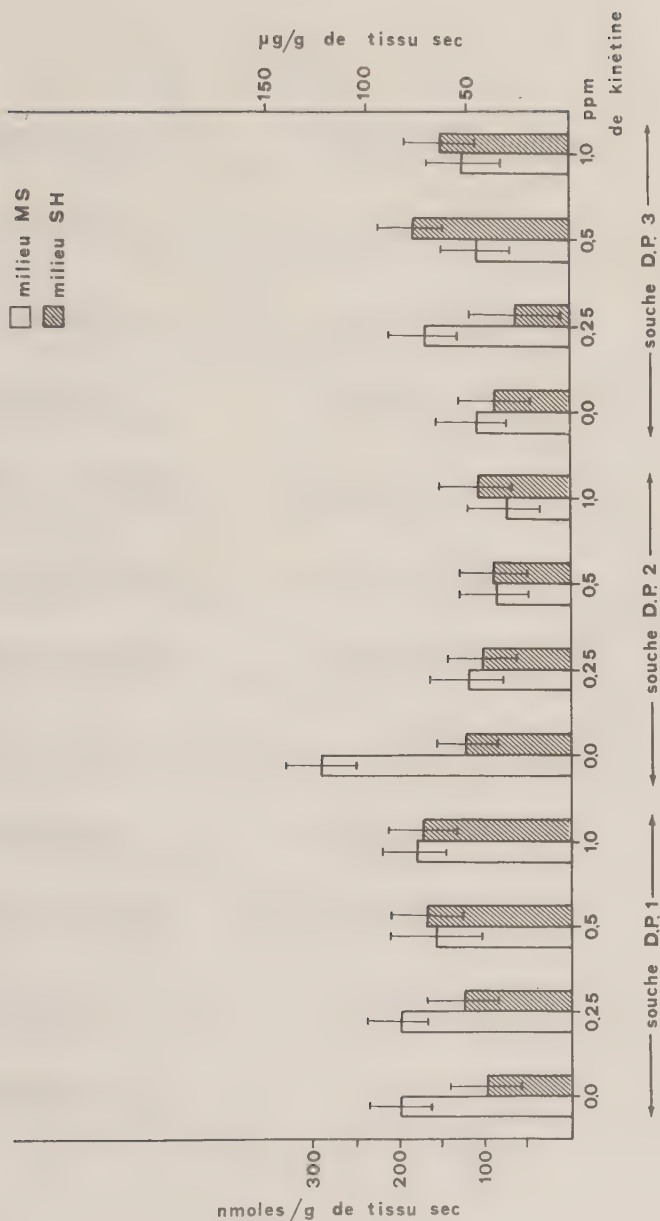


Figure 35
Teneur des tissus en β -sitostérol
(avec limites de tolérance)

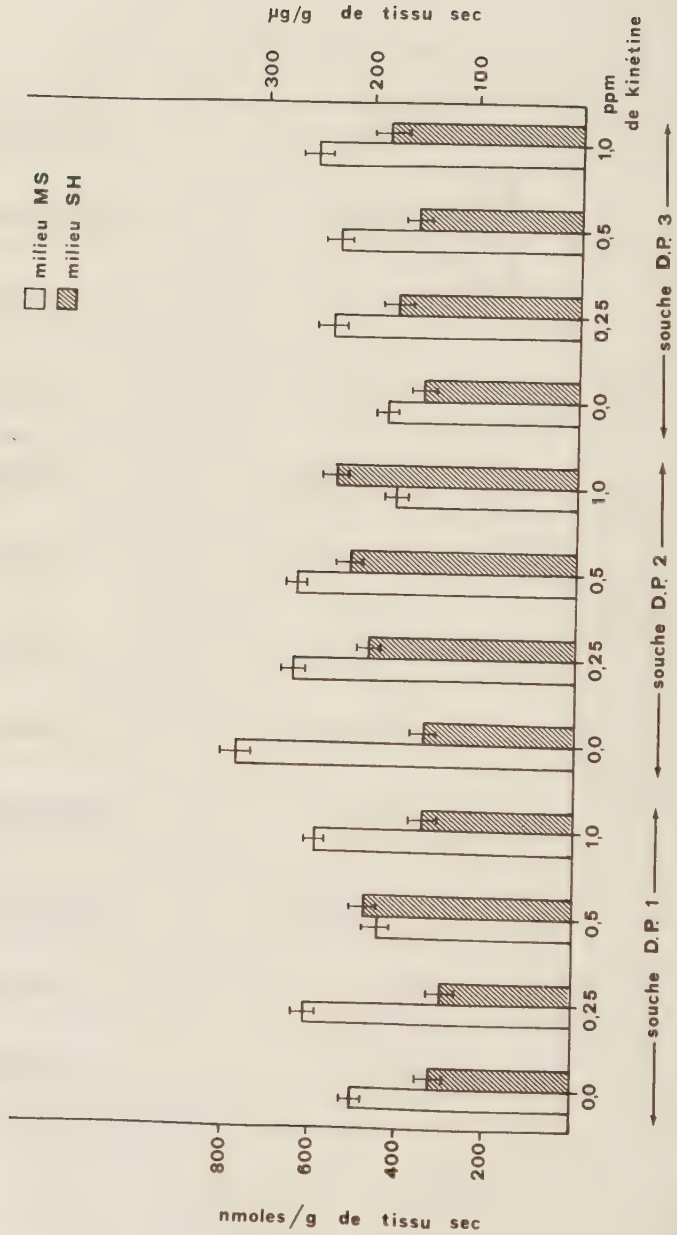


Figure 36

*Teneur des tissus en tigogénine
(avec limites de tolérance)*

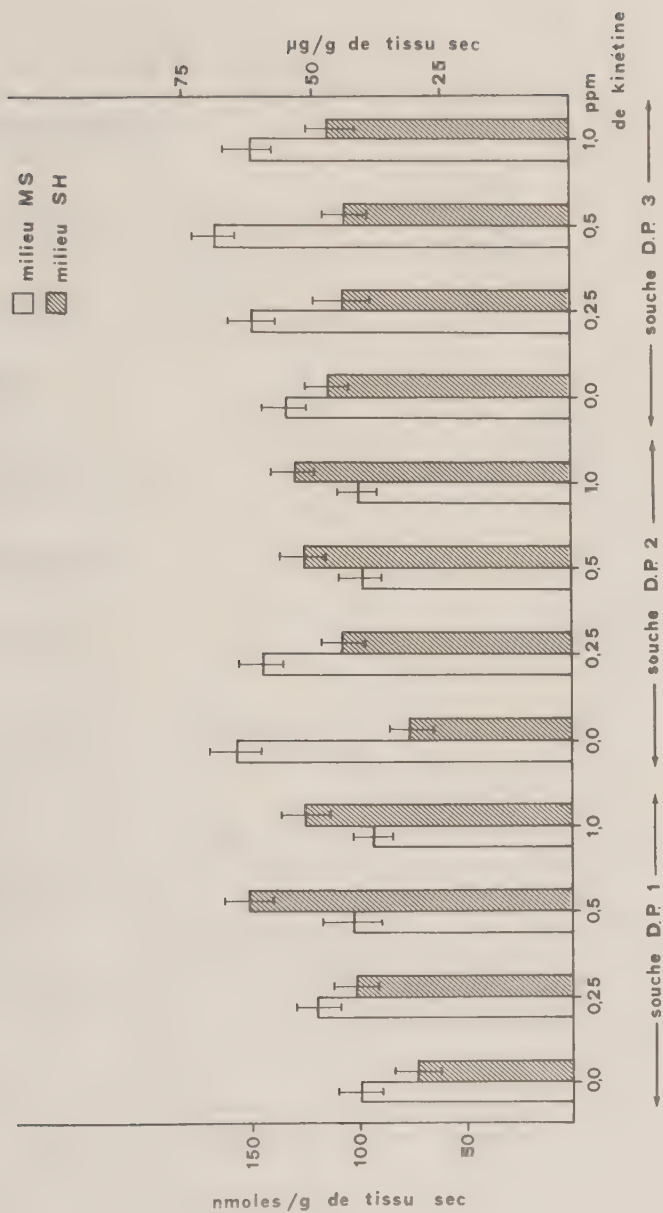


Figure 37
Teneur des tissus en gitogénine
(avec limites de tolérance)

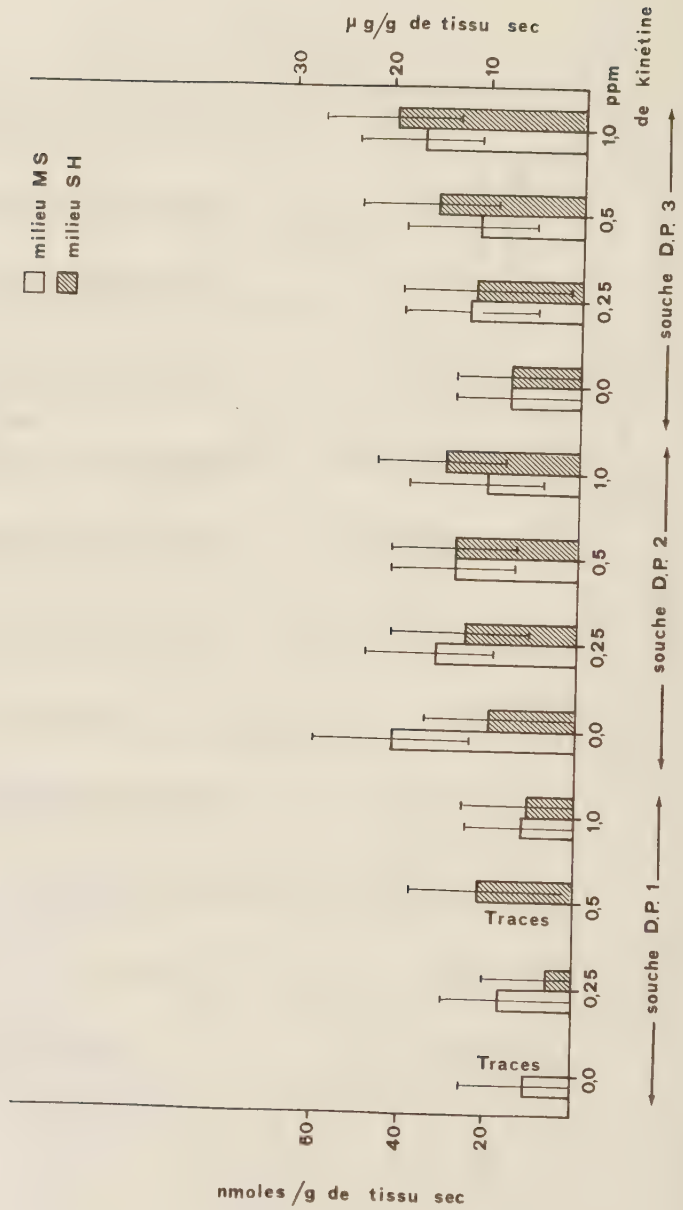


Figure 38

Culture sur milieu MS

Teneur des tissus en dérivés du stérane

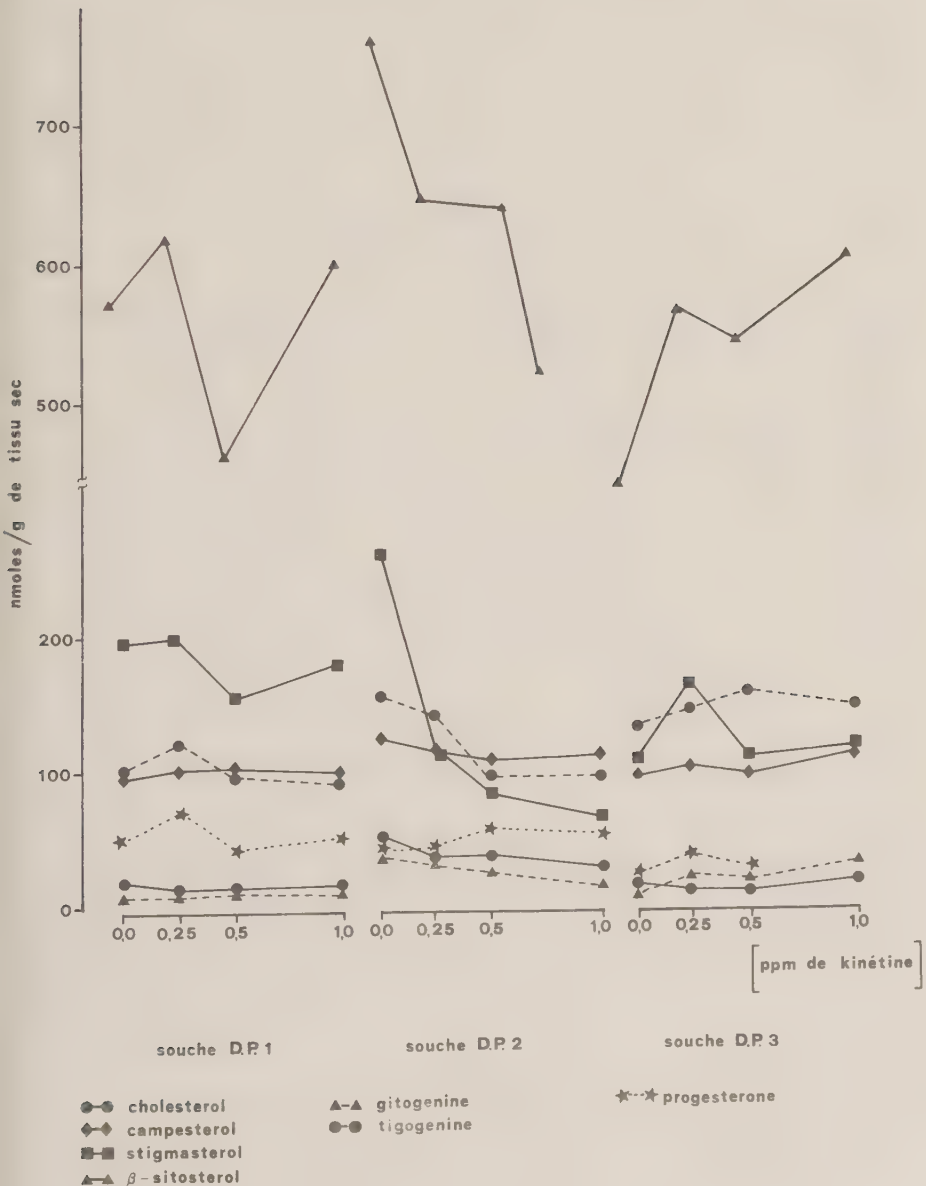
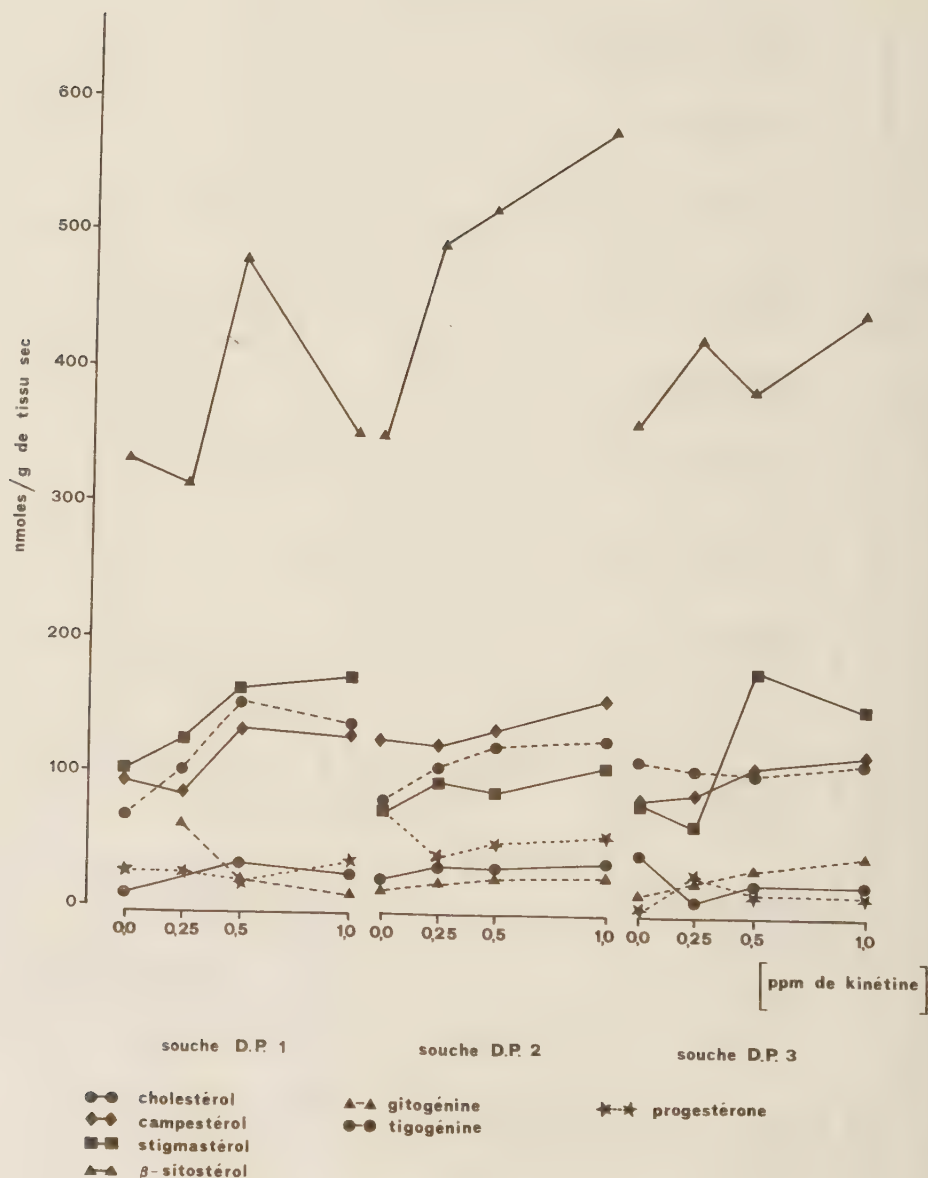


Figure 39

Culture sur milieu SH

Teneur des tissus en dérivés du stérane



VIII Conclusions générales et résumé

Ce travail a été consacré à l'établissement de cultures de tissus de *Digitalis purpurea* L., et à l'analyse qualitative et quantitative des dérivés du stérane que ces tissus produisent dans des conditions bien définies.

Dans la première partie de notre travail (chapitres IV et V), nous décrivons les méthodes et les conditions que nous avons utilisées pour l'établissement et l'entretien des cultures de tissus sur milieu solide et sur milieu liquide.

Les cultures sur milieu solide, ou cultures de cals, ont été maintenues à l'état tout à fait indifférencié pendant plus de trois ans. Nous avons isolé 3 souches, chacune tirant son origine d'une partie différente de la plante (plantule : souche D.P.1, feuille : souche D.P.2, tige : souche D.P.3). Nous avons cultivé ces 3 souches sur 2 milieux nutritifs solides de composition différente :

- le milieu de *Murashige* et *Skoog*, modifié par *Staba* et *Lamba* (MS)
- le milieu de *Schenk* et *Hildebrandt* (SH). Celui-ci diffère du milieu MS par sa composition plus simple, sa teneur plus élevée en thiamine et en saccharose, et sa teneur plus faible en azote inorganique et en myoinositol.

Nous avons entretenu en tout 24 cultures différentes de cals, résultant de la combinaison des 3 paramètres ci-dessous :

- Origine de la souche (D.P.1, D.P.2, D.P.3)
- Composition du milieu (MS, SH)
- Absence de kinétine ou présence, à 3 concentrations différentes (0,25, 0,50, 1,0 ppm.).

Nous avons étudié toutes ces cultures et tenté de discerner l'effet de l'un ou l'autre des 3 paramètres précités, sur l'aspect, la croissance et la production des métabolites secondaires caractéristiques de la Digitale.

Ces essais nous ont permis d'affirmer que les cals forment tous des colonies composées, c'est-à-dire constituées d'un agrégat de nodules de dimensions variables et se séparant très facilement les uns des autres. La consistance des cals de la souche D.P.1 est ferme; les cals issus des deux autres souches ont une consistance molle.

L'utilisation de l'analyse de covariance a permis de mettre en évidence des différences significatives dans la croissance des différents tissus, et de démontrer que les facteurs déterminants sont l'origine de la souche et la composition du milieu nutritif. En effet :

- la souche D.P.1 est celle qui se développe le mieux.
- le milieu SH stimule plus fortement la croissance que le milieu MS, probablement du fait de sa forte teneur en thiamine.
- L'effet de la kinétine n'est pas évident.

Production de dérivés du stérane

a) Hétérosides cardiotoniques :

Nous n'avons pu les mettre en évidence dans aucune culture sur milieu solide.

b) Stérols, sapogénines et précurseurs des cardénolides dérivés du prégnane :

Dans la deuxième partie de ce travail, (chapitre VI) nous décrivons les méthodes mises au point pour l'extraction simultanée de tous ces composés et pour leur séparation par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La CPG, sur deux phases stationnaires différentes, a montré la présence dans les 24 extraits cités, de : cholestérol, campestérol, stigmasterol, β -sitostérol, tigogénine, gitogénine et progestérone (celle-ci dans 22 extraits seulement).

Nous avons constaté également que les extraits contiennent d'autres stérols que nous n'avons pas pu identifier, faute de matière végétale en quantité suffisante.

L'identité des quatre stérols cités ci-dessus a été confirmée par spectrométrie de masse, celle des sapogénines et de la progestérone par chromatographie sur couche mince.

En ce qui concerne les deux autres sapogénines, hydroxylées en 15 β , à savoir la digitogénine et la digalogénine, normalement produites par la Digitale pourpre, nous pensons que la première est absente de nos cultures, mais nous ne pouvons pas nous prononcer sur la présence de la deuxième, faute de substance de référence.

Il est intéressant de constater que tous les composés que nous avons identifiés correspondent à la configuration cis-trans-trans.

Le dosage par chromatographie en phase gazeuse des 7 substances identifiées dans les 24 extraits représentant les combinaisons des trois facteurs étudiés, n'a pas permis de déceler une influence déterminante de l'un ou de l'autre de ces facteurs. Par contre il a montré que :

- le β -sitostérol est le composé le plus abondant dans tous les extraits (~300 à 800 nmoles/g de tissu sec)
- tous les autres composés sont accumulés en quantités beaucoup moins importantes (0 à 200 nmoles/g de tissu sec)
- les composés les moins abondants sont le cholestérol, la progestérone et la digitogénine.

Les cultures en suspension (cellules et agrégats de cellules) ont apporté quelques éclaircissements au problème de la biosynthèse des hétérosides cardiotoniques par les tissus de Digitale cultivés *in vitro*.

Grâce à un système de repiquage particulier et à la modification du milieu nutritif, nous avons obtenu 3 types différents de cultures en suspension :

- 1) culture tout à fait indifférenciée
- 2) culture contenant une faible proportion de racines néoformées
- 3) culture contenant une forte proportion de racines néoformées.

L'analyse de ces 3 types de cultures a démontré que :

- Les cultures tout à fait indifférenciées ne produisent que des traces à peine perceptibles de 2 hétérosides cardiotoniques non identifiés avec certitude, dont l'un pourrait être l'odoroside H.
- Les cultures fortement différenciées produisent des hétérosides cardiotoniques en quantités non négligeables. Ces hétérosides ont été identifiés :

- le glucoévatromonoside
- le digitoxigénine-bisdigitoxosido-glucoside
- le purpuréa-glucoside A
- et, selon toute vraisemblance, l'odoroside H.

En conclusion, nous pouvons affirmer que, dans les conditions que nous nous sommes efforcé de décrire avec toute la précision nécessaire, les tissus de Digitale pourpre cultivés *in vitro* et maintenus à l'état strictement indifférencié sont capables de produire les métabolites secondaires suivants :

cholestérol, campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, tigogénine, digitogénine et progestérone.

Les cultures en suspension, dans lesquelles nous avons stimulé l'apparition d'une organogenèse (formation de racines) ont produit 4 hétérosides cardiotoniques. Cette expérience a prouvé que c'est la présence d'une organisation dans les tissus qui permet la formation de ces métabolites secondaires. Dans notre cas c'est l'apparition de racines qui a stimulé cette biosynthèse alors que dans la plante entière elle a lieu au niveau des feuilles.

A notre connaissance, il n'existait pas jusqu'à ce jour de preuves de la présence des 7 dérivés du stérane cités plus haut dans les cultures de tissus de *Digitalis purpurea*. Au

moment où nous rédigeons ce travail, nous avons pris connaissance de la publication de *Pilgrim* (Phytochemistry 16, 1311, 1977) faisant état de la formation de tigogénine et de gito-génine dans les cultures de tissus de Digitale pourpre, ce qui confirme les résultats que nous avons obtenus.

IX BIBLIOGRAPHIE

1. *Constabel F. et coll.*, *Planta Med.* 25, 158 (1974).
2. *West F.R. et Mika E.S.*, *Bot. Gaz.* 119, 50 (1957).
3. *Tulecke W. et Nickell L.G.*, *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 22, 196, (1960).
4. *Tulecke W. et Nickell L.G.*, *Science* 130, 863 (1959).
5. *Nickell L.G. et Tulecke W.*, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. II.* 3, 287 (1960).
6. *Staba E.J.*, *J. Pharm. Sci.* 51, 249 (1962).
7. *Büchner S.A. et Staba E.J.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 733 (1964).
8. *Staba E.J. et Lamba S.*, *Lloydia* 26, 29 (1963).
9. *Kaul B., Wells P. et Saba E.J.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 19, 760 (1967).
10. *Medora R.S. et coll.*, *J. Pharm. Sci.* 56, 540 (1967).
11. *Pilgrim H.*, *Pharmazie* 25, 568 (1970).
12. *Pilgrim H.*, *Phytochemistry* 11, 1725 (1972).
13. *Petiard V. et coll.*, *Plant. Med. Phytother.* 6, 41 (1972).
14. *Turner T.D.*, *Bull. O.N. Pharm.* 137, 1037 (1971).
15. *Kartnig Th. et coll.*, *Planta Med.* 29, 275 (1976).
16. *Tschesche R. et coll.*, *Z. Naturforsch.* 22b, 677 (1967).
17. *Varma K.R. et Caspi E.*, *Phytochemistry* 9, 1539 (1970).
18. *Tschesche R. et Kleft U.*, *Phytochemistry* 12, 2375 (1973).
19. *Tschesche R. et Hulpke H.*, *Z. Naturforsch.* 21b, 494 (1966).
20. *Joly R. et Tamm Ch.*, *Tetrahedron Lett.* 36, 3535 (1967).

21. Heftmann E., *Lloydia* 31, 293 (1968).
22. Varma K.S. et coll., *J. Biol. Chem.* 244, 3951 (1969).
23. Haberlandt G., *Sber. Akad. Wiss. (Wien)*, 111, 69 (1902).
24. White P.R., *Plant Physiol. (Lancaster)* 12, 803 (1937).
25. Gautheret R.J., *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 198, 2195 (1934).
26. White P.R., *Plant Physiol. (Lancaster)* 12, 803 (1937).
27. Went F.W. et Thimann K.V., *Phytohormones*, MacMillan Co., New York, 1937.
28. White P.R., *Am. J. Bot.* 26, 59 (1939).
29. Gautheret R.F., *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 208, 118 (1939).
30. Nuir W.H. et coll., *Science* 119, 877 (1954).
31. Bergmann L., *J. Gen. Physiol.* 43, 841 (1960).
32. Cocking E.C., *Nature* 187, 927 (1960).
33. Nagata T. et Takebe I., *Planta* 99, 12 (1971).
34. Power J.B. et Cocking E.C., *Sci. Prog.* 59, 181 (1971).
35. Miller R.A. et coll., *Can. J. Genet. Cytol.* 13, 347 (1971).
36. Gamborg O.L. et coll., *Can. J. Genet. Cytol.* 16, 737 (1974).
37. Kao K.N. et coll., *Planta* 120, 215 (1974).
38. Street H.E., *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.
39. Constabel F. et coll., *Planta Med.* 25, 158 (1974).
40. Morel G.M., *Am. Orchid Soc. Bull.* 29, 495 (1960).
41. Morel G.M., *Am. Orchid Soc. Bull.* 33, 473 (1964).
42. Speake T. et coll., *Nature* 201, 614 (1964).
43. Carew D.P., *Nature* 207, 89 (1965).
44. Tulecke W. et Nickell L.G., *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 22, 196 (1960).
45. Erhardt E. et coll., *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 262, 809 (1966).

46. Nickell L.G., Adv. Appl. Microbiol. 4, 213 (1962).
47. Braun A.C., Proc. Nat. Acad. Sci. V.S. 45, 932 (1959).
48. Hart J.W. et coll., Ann. Bot. 34, 789 (1970).
49. West F.R. et Mika E.S., Bot. Gaz. 119, 50 (1957).
50. Tulecke W. et Nickell L.G., Science 130, 863 (1959).
51. Nickell L.G. et Tulecke W., J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. II. 3, 287 (1960).
52. Harris A.L. et coll., Lloydia 27, 322 (1964).
53. Chan W.N. et Staba E.J., Lloydia 28, 55 (1965).
54. Benveniste P.L. et coll., Phytochemistry 5, 31 (1966).
55. Jain S.C. et Khanna P., Indian J. Pharm. 35, 163 (1973).
56. Jain S.C. et coll., Planta Med. 31, 109 (1977).
57. Kaul B. et Staba E.J., Lloydia 31, 171 (1968).
58. Mehta A.R. et Staba E.J., J. Pharm. Sci. 59, 864 (1970).
59. Khanna P. et Jain S.C., Lloydia 36, 96 (1973).
60. Kaul B. et Staba E.J., Planta Med. 15, 145 (1967).
61. Reinhard E., Dtsch. Apoth. Ztg. 107, 1201 (1967).
62. Third International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Leicester, England, 1974.
63. Furuya T. et Kojima H., Phytochemistry 10, 1607 (1971).
64. Steck W. et coll., Phytochemistry 10, 191 (1971).
65. Furuya T. et coll., Chem. Pharm. Bull. 18, 1080 (1970).
66. Reinhard E., Third International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Leicester, England, 1974.
67. Furuya T. et coll., Phytochemistry 10, 1013 (1971).
68. Furuya T. et coll., Phytochemistry 12, 1621 (1973).
69. Gruetzmann K.D. et Schroeter H.B., Abh. Dtsch. Akad. Wiss. (Berlin) 347, (1966).

70. Evans F.J., J. Pharm. Pharmacol. 24, 227 (1972).
71. Hegnauer R., Chemotaxonomie der Pflanzen VI, Birkhäuser Verlag, Basel, 1973.
72. Tschesche R. et coll., Tetrahedron 19, 621 (1963).
73. Tomita Y. et coll., Phytochemistry 9, 111, (1970).
74. Tschesche R., Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, vol. 24, Springer Verlag, Wien - New York, 1966, p. 99.
75. Tschesche R. et Buschaver G., Ann. Chem. 603, 59 (1957).
76. Williams B.L. et coll., Phytochemistry 6, 1137 (1967).
77. Barrera J.B. et coll., Ann. Roy. Soc. Esp. Fis. Quim. 63B, 191 (1967).
78. Goad L.J. et Goodwin T.W., Eur. J. Biochem. 3, 232 (1967).
79. Joly R. et Tamm Ch., Tetrahedron Lett. 36, 3535 (1967).
80. Varma K.R. et coll., J. Biol. Chem. 244, 3951 (1969).
81. Tschesche R. et coll., Phytochemistry 7, 2021 (1968).
82. Tschesche R. et coll., Phytochemistry 9, 371 (1970).
83. Tschesche R. et Leinert J., Phytochemistry 12, 1612 (1973).
84. Tschesche R. et Hulpke H., Z. Naturforsch. 21b, 494 (1966).
85. Tschesche R. et Lilienweiss G., Z. Naturforsch. 19b, 265 (1964).
86. Tschesche R. et coll., Z. Naturforsch. 22b, 677 (1967).
87. Caspi E. et coll., Experientia 22, 505 (1966).
88. Wickramasinghe J.A.F. et coll., Phytochemistry 8, 1433 (1969).
89. Bennett R.D. et Heftmann E., Phytochemistry 8, 2325 (1969).
90. Heller R., Ann. Sci. Nat., (paris) 14, 1 (1953).
91. Murashige T. et Skoog F., Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
92. White P.R., The Cultivation of Animal and Plant Cells, 2ème éd., Ronald Press, New York, 1963.

93. *Gamborg O.L. et coll.*, *Exp. Cell. Res.* 50, 151 (1968).
94. *Nitsch J.P. et Nitsch C.*, *Science* 163, 85 (1969).
95. *Schenk R.V. et Hildebrandt A.C.*, *Can. J. Bot.* 50, 199, (1972).
96. *Torrey J.G. et Reinert J.*, *Plant Physiol.* 36, 483 (1961).
97. *Tsao D.P.N. et Youngkenn H.W.*, *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)* 41, 407 (1952).
98. *Risser P.G. et White P.R.*, *Physiol. Plant.* 17, 620 (1964).
99. *Torrey J.G. et Shigemura Y.*, *Am. J. Bot.* 44, 334 (1957).
100. *Linsmaier E.M. et Skoog F.*, *Physiol. Plant.* 18, 100 (1965).
101. *Eriksson T.*, *Physiol. Plant.* 18, 976 (1965).
102. *Staba E.J.*, *J. Pharm. Sci.* 51, 249 (1962).
103. *Nitsch J.P.*, *The Biological Action of Growth Substances*, Academic Press, New York, 1957.
104. *Lin M. et Staba E.J.*, *Lloydia* 24, 139 (1961).
105. *Turner T.D.*, *Bull. O.N. Pharm.* 137, 1037 (1971).
106. *Staba E.J. et Lamba S.*, *Lloydia* 26, 29 (1963).
107. *Pilgrim H.*, *Pharmazie* 32, 129 (1977).
108. *Kaul B. et coll.*, *Lloydia* 32, 347 (1969).
109. *Mohandas T. et Grant W.F.*, *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 773 (1972).
110. *Nitsch J.P.*, *Phytomorphology* 19, 389 (1969).
111. *Halmer P. et Thorpe T.A.*, *Phytochemistry* 15, 1585 (1976).
112. *Sargent J.A. et Skoog F.*, *Plant. Physiol.* 35, 934 (1960).
113. *Linsmaier E.M. et Skoog F.*, *Planta* 72, 146 (1967).
114. *Digby J. et Skoog F.*, *Plant Physiol.* 41, 647 (1966).
115. *Gamborg O.L.*, *Plant Tissue Culture Methods*, publié par le Conseil National de la Recherche du Canada, Saskatoon, 1975.

116. Chan W.N. et Staba E.J., Am. Pharm. Assoc. Abstracts 149, (1964).
117. Montant J., C.R. Soc. Biol. 151, 391 (1957).
118. Pilgrim H., Phytochemistry 11, 1725 (1972).
119. Gautheret R.J., La Culture des Tissus Végétaux, Techniques et réalisations, Ed. Masson, Paris, 1959.
120. Jagendorf et coll., Bot. Gaz. 113, 334 (1952).
121. Büchner S.A. et Staba E.J., J. Pharm. Pharmacol. 16, 733 (1964).
122. Stohs S.J. et Staba E.J., J. Pharm. Sci. 54, 56 (1965).
123. Kaul B. et coll., J. Pharm. Pharmacol. 19, 760 (1967).
124. Pilgrim H., Pharmazie 27, 121 (1972).
125. Seibert M. et coll., Plant Physiol. 56, 130 (1975).
126. Muir W.H. et coll., Am. J. Bot. 45, 589 (1958).
127. Butcher D.N., Secondary Products in Tissue Cultures, dans J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, Springer Verlag, Berlin, 1977.
128. Dixon W.J., Biomedical Computer Programm, University of California Press, Berkeley et Los Angeles, 1968, p. 525.
129. Kartnig Th. et Kobosil P., Planta Med. 31, 221 (1977).
130. Wang C. et Staba E.J., J. Pharm. Sci. 52, 1058 (1963).
131. Wilson S.B. et coll., J. Exp. Bot. 21, 177 (1971).
132. Bayliss M.W., Plant Tissue and Cell Culture, Street H.E., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973, p. 148.
133. Jones L.E. et coll., Am. J. Bot. 47, 468 (1960).
134. Staba E.J. et coll., Proceedings International Conference on Plant Tissue Culture, Ph. R. White, 1965.
135. Pharmacopoea Helvetica VI, tome II, p. 597.
136. Kapetanidis I., (à paraître).
137. Eide-Jürgensen G. et coll., Planta Med. 20, 98 (1971).

138. *Kartnig Th. et coll.*, *Planta Med.* 29, 275 (1976).
139. *Petiard V. et coll.*, *Plantes Med. Phytotherap.* 6, 41 (1972).
140. *Cowley P.S. et coll.*, *Planta Med.* 19, 249 (1971).
141. *Jacobsohn G.M. et Frey M.J.*, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3338, (1967).
142. *Cowley P.S. et Evans F.J.*, *Planta Med.* 22, 89 (1972).
143. *Evans F.J.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 233S (1971).
144. *Heftmann E.*, *Lloydia* 30, 209 (1967).
145. *Lockwood G.B. et coll.*, *J. Chromatogr.* 95, 250 (1974).
146. *Fazli F.R.Y. et Hardman R.*, *Phytochemistry* 10, 2497 (1971).
147. *Marshall J.G. et Staba E.J.*, *Lloydia* 39, 84 (1976).
148. *Jacobsohn G.M. et Frey M.J.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 655 (1968).
149. *Keller C.J. et coll.*, *J. Agric. Food Chem.* 17, 331 (1969).
150. *Vahouny G.V. et coll.*, *Anal. Biochem.* 1, 371 (1960).
151. *Wall M.E. et coll.*, *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)* 46, 653, (1957).
152. *Blunden G. et coll.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 274 (1965).
153. *Hardman R. et Jefferies T.M.*, *Analyst* 97, 437 (1972).
154. *Blunden G. et Hardman R.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 15, 273 (1963).
155. *Wall M.E., Krider M.M. et coll.*, *J. Biol. Chem.* 198, 533 (1952).
156. *Morris M.P. et coll.*, *J. Agr. Food. Chem.* 6, 856 (1958).
157. *Wall. M.E. et coll.*, *Anal. Chem.* 24, 1337 (1952).
158. *Stohs S.J. et Obrist J.J.*, *Phytochemistry* 14, 239 (1975).
159. *Sander E. et coll.*, *Planta Med.* 9, 8 (1961).
160. *Tschesche R. et coll.*, *Tetrahedron* 18, 959 (1962).
161. *Kawasaki T. et Nishioka I.*, *Chem. Pharm. Bull.* 12, 1311 (1964).

162. *Blunden G. et Hardman R.*, J. Chromatogr. 34, 507 (1968).
163. *Cowley P.S. et coll.*, J. Chromatogr. 54, 185 (1971).
164. *Black R.A. et Andreassen A.A.*, J.A.O.A.C. 56, 1357 (1973).
165. *Benett R. et Heftmann E.A.*, J. Chromatogr. 12, 245 (1963).
166. *Heftmann E.*, Chromatography of Steroids, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1976.
167. *Goad L.J. et Goodwin T.W.*, Eur. J. Biochem. 1, 357 (1967).
168. *Nickoleit R.*, Thèse, Université de Tübingen, 1971.
169. *Evans F.J.*, J. Pharm. Pharmacol. 25, 156 (1973).
170. *Patterson G.W.*, Anal. Chem. 43, 1165 (1971).
171. *Grunwald C.*, J. Chromatogr. 44, 173 (1969).
172. *Grunwald C.*, Anal. Biochem. 34, 16 (1970).
173. *Rozanski A.*, Anal. Chem. 38, 36 (1966).
174. *Ballantine J.A. et coll.*, J. Chromatogr. 103, 289 (1975).
175. *Gleispach H.*, J. Chromatogr. 91, 407 (1974).
176. *Pierce A.E.*, Silylation of Organic Compounds, Ed. Pierce Chemical Co, U.S.A, 1968.
177. *Vogel A.I.*, A text-Book of Practical Organic Chemistry, Longmans, London, 3ème éd., 1961, p. 175.
178. *Knights B.A.*, J. Gaz Chromatogr. 5, 273 (1967).
179. *Van Denheuvel W.J. et Horning E.C.*, J. Org. Chem. 26, 634 (1961).
180. *Jain S.C.*, Lloydia 39, 244 (1976).
181. *McFadden W.*, Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry : Application in Organic Analysis, Wiley-Interscience, New-York, 1973.
182. *Liebermann C.*, Ber. 18, 1803 (1885).
183. *Moore P.R. et Baumann C.A.*, J. Biol. Chem. 195, 615 (1952).
184. *Mass Spectrometry Data Centre, AWRE, Aldermaston, Berkshire.*

185. Ew J.v. et Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* 49, 1468 (1966).
186. Sucrow W. et Winkler D., *Phytochemistry* 14, 539 (1975).
187. Ew J.v. et Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* 47, 711 (1964).
188. Bennett R.D. et Heftmann E., *J. Chromatogr.* 9, 353 (1962).
189. Tschesche R. et Wulff G., *Chem. Ber.* 94, 2019 (1961).
190. Elmunajjed D.T. et coll., *Phytochemistry* 4, 587 (1965).
191. Blunden G. et coll., *J. Pharm. Sci.* 56, 948 (1967).
192. Brain K.R. et Hardman R., *J. Chromatogr.* 38, 355 (1968).
193. Heftmann E. et coll., *J. Chromatogr.* 21, 488 (1966).
194. Kawasaki T. et Miyahara K., *Chem. Pharm. Bull.* 11, 1546 (1963).
195. Bennett R. et Heftmann E., *J. Chromatogr.* 9, 348 (1962).
196. Stahl E., *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriums-handbuch*, Springer-Verlag, Berlin, 2ème éd., 1967, pp. 827 et 852.
197. Rowland F.W. et Ramond D., *La Pratique de la Chromatographie en phase gazeuse*, Hewlett Packard, France, 1974.
198. Künzler W., Thèse No 1700, Université de Genève, 1975.
199. Evans F.J., *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 645 (1972).
200. Evans F.J. et Cowley P.S., *Phytochemistry* 11, 2971 (1972).

